

**SYNTHESE UND CHARAKTERISIERUNG VON
MONOSCHICHTIGEN VESIKELMEMBRANEN AUS
FUNKTIONALISIERTEN MALEINSÄURE-
MAKROTETROLIDEN**

INAUGURAL-DISSERTATION

zur

Erlangung der Doktorwürde
des Fachbereichs Chemie
der Freien Universität Berlin

vorgelegt von

JOACHIM MATHIEU

aus Hohenecken

1984



Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41548817_0038

Druck: Copy-Center in Dahlem
Ladenbergstraße 2-4
1000 Berlin 33
Tel. 831 40 25

SYNTHESE UND CHARAKTERISIERUNG VON MONOSCHICHTIGEN
VESIKELMEMBRANEN AUS FUNKTIONALISIERTEN MALEINSÄURE-
MAKROTETROLIDEN

INAUGURAL - DISSERTATION
zur
Erlangung der Doktorwürde
des Fachbereichs Chemie
der Freien Universität Berlin

vorgelegt von
JOACHIM MATHIEU
aus Hohenecken

1. Referent: Prof. Dr. J.-H.Fuhrhop
2. Referent: Prof. Dr. H.Baumgärtel

Tag der mündlichen Prüfung: 16.10.84

Meiner Mutter und meinen
Geschwistern

Die vorliegende Arbeit wurde in der Zeit vom Dezember 1979 bis März 1984 am Institut für Organische Chemie der Freien Universität Berlin unter der Leitung von Herrn Professor Dr. J.-H. Fuhrhop angefertigt.

Herrn Professor Dr. J.-H. Fuhrhop gilt mein aufrichtiger Dank für die vielseitigen Anregungen, seine stete Diskussionsbereitschaft und seine zahlreichen wertvollen Hinweise, die die Grundlage für die Entwicklung und das Gelingen dieser Arbeit waren.

Besonders danke ich auch den Damen und Herren der physikalischen Meßabteilungen und des Mikrolabors für die schnelle Aufnahme der Spektren und der Elementaranalysen. Ebenso danke ich Frau Hentschke vom Institut für Elektronenmikroskopie der Freien Universität Berlin für Ihre Unterstützung bei der Anfertigung der elektronenmikroskopischen Aufnahmen.

Ebenso danke ich Herrn M. Nowak für die elektronenmikroskopischen Aufnahmen der gefriergeätzten Präparationen.

INHALTSVERZEICHNIS

	Seite
1. <u>Einleitung und Problemstellung</u>	1
1.1. MLM-Vesikelbildung durch "einseitige Fällung"	2
1.2. MLM-Vesikeln mit gelösten, raumfüllenden Komponenten ("spacer")	3
1.3. Unsymmetrische Vesikel-MLMs	3
1.4. Anwendungen für natürliche und synthetische Vesikel	7
2. <u>Hydrophobe Gerüste -Makrotetrolide-</u>	8
2.1. Syntheseprobleme bei der Darstellung von makrocyclischen Verbindungen	8
2.2. Photochemische und thermische Umlagerungen des 1,6,19,24-tetraoxa-cyclohexatriaconta-3,21-dien-2,5,20,23-tetrons	14
2.3. Bromaddition an die Maleinsäuretetrolide	18
3. <u>Doppelschichtmembranen aus Succinatester-Amphiphilen</u>	21
3.1. Michael-Addition von schwefelhaltigen Nucleophilen an den Maleinsäuredihexadecylester	21
4. <u>Synthese von MLM-Vesikelbildnern aus Maleinsäuretetroliden</u>	28
4.1. Symmetrische Bolaamphiphile aus Maleinsäuretetroliden	28
4.2. Unsymmetrische monoschichtige Bolaamphiphile	34
4.3. ^1H -NMR-Spektren der monosubstituierten Bernstein-derivate und Vergleichsspektren	39
4.3.1. Detaillierte Interpretation des ^1H -NMR-Spektrums des Thioacetatamphiphilen <u>30</u>	43
4.4. Intramolekulare asymmetrische Induktion durch die Sulphinylgruppe	45
4.5. Chirale Erkennung an Bernsteinsäurederivaten	47
5. <u>Phosphorsäureester als membranbildende Amphiphile</u>	48
5.1. Spektroskopische Charakterisierung von Phosphorsäureestern	50
5.1.1. IR-Spektroskopie	50
5.1.2. ^1H -NMR-Spektroskopie von Phosphorsäureestern	50
5.1.3. Massenspektren	53
5.2. Charakterisierung der Phosphorsäureamphiphile	54
5.2.1. Elektronenmikroskopie	54
5.2.2. Oberflächenspannungsmessungen an den Phosphor-	58

säuremakrotetroliden	
5.2.3. Einschlußversuche und Wechselwirkung mit Farbstoffen	58
5.3. Membranbildung mit "Nicht-Amphiphilen"	59
5.3.1. Titration einer beschallten Carminsäurelösung	63
6. <u>Charakterisierung der Bernsteinsäurevesikeln</u>	68
6.1. Elektronenmikroskopie an Bernsteinsäurevesikeln	69
6.2. Metachromasie	81
6.3. Einschlußversuche mit Magnesium-octaethylporphin	91
6.3.1. Einschluß von MgOEP in die unsymmetrische MLM-Vesikelmembran	92
6.3.2. Einschluß von MgOEP in eine symmetrische negativ geladene Vesikel	94
6.3.3. Einschluß von MgOEP in eine neutrale MLM-Vesikel	95
6.3.4. Einschluß von MgOEP in ein Phosphorsäuretetrolid	96
6.3.5. Einschluß von MgOEP in doppelschichtige Vesikelmembranen	96
6.4. Chemische Nachweise für die Vesikelbildung durch Einschluß von redox-abhängigen Verbindungen	97
6.4.1. Vesikelnachweis mit Methylenblau	97
6.4.2. Vesikelnachweis durch Reduktion von eingeschlossenen Paraquat-Amphiphilen	97
6.5. ^1H -NMR-Spektroskopie von Vesikellösungen	99
6.6. Stabilität von Vesikellösungen	103
6.7. Schichtdicke der Membranen	104
6.8. Diskussion	106
6.9. Zusammenfassung	109
7. <u>EXPERIMENTELLER TEIL</u>	110
8. <u>Literaturverzeichnis</u>	139

1. EINLEITUNG UND PROBLEMSTELLUNG

Verwendet man zur Vesikelbildung Amphiphile mit hydrophilen Kopfgruppen an beiden Enden der hydrophoben Ketten (Trivialname: Bolaamphiphile ¹, abgeleitet von der einem südamerikanischen Schleudergerät ähnlichen Form), so werden Membranen aus einer einzigen Molekülschicht (monolayer lipid membrane, MLM) erhalten. Die MLM-Vesikeln weisen gegenüber den üblichen BLM-Vesikeln drei Vorteile auf:

1. BLM-Vesikeln wachsen durch Fusion und fallen aus der Lösung meist nach einigen Tagen aus. Bei MLM-Vesikeln sollte die Fusionierung erschwert sein, weil der innere hydrophile Kopf die Membran kaum durchdringen kann, und deshalb die Wanderung der Amphiphile von einer Vesikel zur anderen kaum möglich ist (vgl. Abb. 1). MLM-Vesikellösungen sollten unter geeigneten Bedingungen langzeitstabil sein.

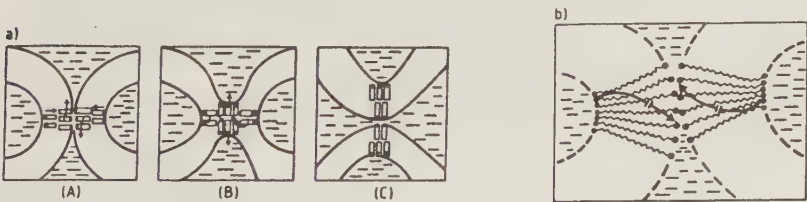
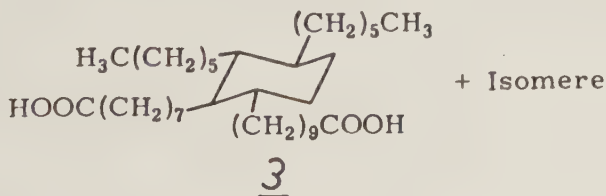


Abb. 1:a) Die Verschmelzung (Fusion) von Vesikelmembranen setzt die Rotation (oder Diffusion) von Molekülen der BLM voraus:(A) Aggregat zweier Vesikeln, (B)Brückenbildung, (C)Passagenbildung (=Fusion). - b) Bei monoschichtigen Vesikeln folgt auf die Aggregation keine oder eine sehr langsame Fusion.

2. Monoschichtige Membranen können wesentlich dünner sein als doppelschichtige Membranen. Solche dünnen Membranen sind von Interesse, weil sie mit etwa 20 Å langen Porenbildnern überbrückt werden können. Kurze Porenbildner sind wiederum besser zugänglich als 30-40 Å lange Porenbildner für BLMs. Viele Naturstoffe (z.B. Porphyrine, Carotine, Steroide) haben eine Moleküllänge von etwa 20 Å. Geeignete Derivate und ihre Mole-

1.2. MLM-Vesikeln mit gelösten, raumfüllenden Komponenten ("spacer")

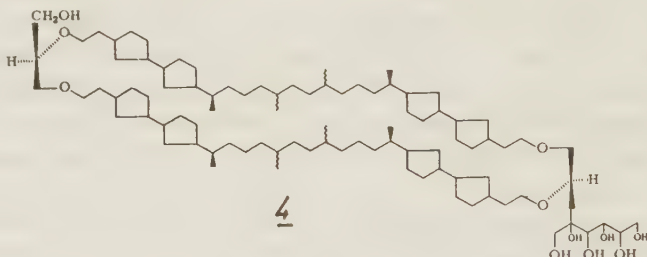
Die ersten Vesikeln aus einem symmetrischen Bolaamphiphil, dem Bisammoniumbromid 2, wurden von Kunitake et al. ⁷ nur erhalten, wenn der Emulsion bei der Beschallung Cholesterin zugesetzt worden war. Das wasserunlösliche Steroid ist in der Membran gelöst und bewirkt dort die Krümmung der Vesikel. Ein ähnlicher Effekt wurde bei dem billigsten Bolaamphiphil, der handelsüblichen "Dimersäure" 3, beobachtet ⁸. Diese bildet beim Beschallen keine Vesikeln, die milchige Suspension von 3 in Wasser klärt sich auch im Falle extrem niedriger Konzentrationen ($\leq 10^{-5} \text{M}$) nicht. Wird jedoch Cyclohexylamin in geringem Überschuß als "spacer" hinzugegeben, so erhält man ohne Schwierigkeiten klare Vesikellösungen oder klare Gele bis zu Konzentrationen von 10^{-2}M .



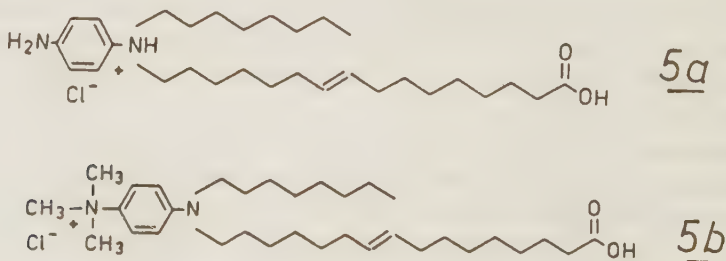
1.3. Unsymmetrische Vesikel-MLMs

Die säure- und lichtbeständigen Membranen des Archaeobakteriums *Caldariella acidophila* enthalten den makrocyclischen Tetraether 4 mit einer (kleinen) Glyzerin- und einer (großen) Nonitol-Kopfgruppe. Messungen von asymmetrischen Strom-Spannungskurven und spezifischen Kapazitäten an sogenannten schwarzen Lipidmembranen (planare Lipidmembranen mit Schichtdicken $\leq 10 \text{ nm}$) deuten darauf hin, daß die künstlich aus 4 gebildeten Membranen aus einer einzigen Molekülschicht bestehen, in der die großen Köpfe auf der einen, die kleinen Köpfe auf der anderen Seite angeordnet sind ⁴. Man kann diesen Befund einfach erklären, wenn man berücksichtigt, daß das Nonitolende mit sechs Hydroxylgruppen aus n-Alkandispersionen, wie sie bevorzugt zur Präparation von schwarzen Membranen verwendet werden, auskristallisieren sollte. Ähnlich wie bei der im

Abschnitt 1.1. beschriebenen Vesikelbildung durch partielle Bildung unlöslicher Salze beginnt auch hier die Bildung einer unsymmetrischen Membran mit der einseitigen Aggregation der Kopfgruppen von Bolaamphiphilen.



Im Rahmen dieser Arbeit sollte versucht werden, ob es möglich ist, daß der hydrophobe Teil von MLM-Amphiphilen verkürzt werden kann, ohne daß die Fähigkeit zur Vesikelbildung beeinträchtigt wird. Die Fläche der hydrophoben Membran kann erhalten bleiben, wenn man für eine lange Kette zwei kurze Ketten verwendet. Von dieser Voraussetzung ausgehend, kann man Bolaamphiphile konstruieren bei denen das hydrophobe Molekülgerüst offenkettig oder cyclisch ist. Die offenkettige Version ist in den von H.Bartsch und J.-H.Fuhrhop ⁹ beschriebenen p-Phenylendiaminamphiphilen 5a und 5b verwirklicht. Diese Arbeit beschäftigt sich mit der Einführung von Makrocyclen als hydrophobes Gerüst der zu bildenden Membranen.



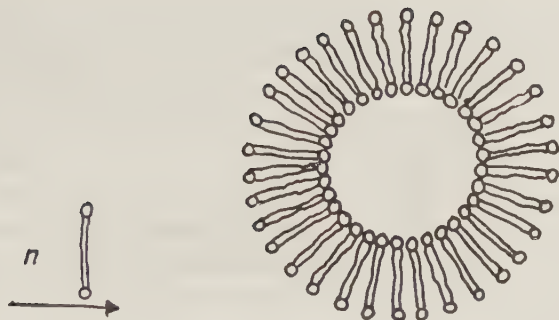


Abb. 3: Modell einer monoschichtigen Vesikelmembran mit makrocyclischem hydrophoben Gerüst.

Die Synthese von Maleinsäuremakrotetroliden und deren Funktionalisierung zu Bolaamphiphilen, sowie die Darstellung von Phosphorsäuretetroliden, sollte versucht werden. Durch die Verwendung dieser makrocyclischen Ester im hydrophoben Bereich sollte es möglich sein die Dicke der Membran zu verkürzen. Die Erzeugung sehr dünner Membranen bietet den Vorteil, daß normale organische Verbindungen als Überträger von Protonen und Elektronen ohne Diffusionsprozesse denkbar sind. Mit diesen Porenbildnern könnte der Durchtritt von polaren Substanzen über die Membran um einige Zehnerpotenzen gesteigert werden. Ein weiterer Vorteil der dünnen Membran könnte es sein, daß regioselektive Einschlüsse und die Organisation von komplexen Reaktionssystemen eventuell besser gelingen als in BLM-Vesikeln. Der Abstand benachbarter Reaktionspartner wäre in MLM-Vesikeln kürzer und die Reaktion wahrscheinlicher. Die dünne Membran könnte ein anderes Schmelzverhalten besitzen als die doppelschichtigen Membranen.

Als zweite Voraussetzung sollten die synthetisierten makrocyclischen Verbindungen einen amphiphilen Charakter besitzen oder die Möglichkeit zur selektiven Funktionalisierung haben, so daß neben symmetrischen auch unsymmetrische Vesikelbildner gewonnen werden können. Die Asymmetrie der Membran spielt bei Ladungstrennungsprozessen, z.B. der Photolyse des Wassers, eine elementare Rolle.

Von dem Maleinsäuremakrotetrolid ausgehend schien die Synthese eines vollständig unsymmetrischen Bolaamphiphils möglich (Abb.4). Durch schrittweise Michael-Addition von verschiedenen Schwefelnucleophilen sollte eine selektive Auflösung der Doppelbindungen erfolgen.

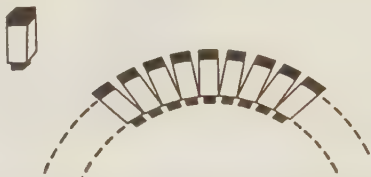


Abb. 4: Eine unsymmetrische monoschichtige Vesikelmembran

Nach der erfolgreichen Synthese müssen die neuen Membranen charakterisiert werden. Die wichtigsten Fragen dabei sind, ob unsymmetrische Bolaamphiphile eine Orientierung der Kopfgruppen erlauben, ob es Beweise für die vermutete dünne Membran gibt und welche Unterschiede zu den bekannten BLM- und MLM-Vesikelbildnern auftreten. Elektronenmikroskopische Untersuchungen, temperaturabhängige ^1H -NMR-Spektroskopie, Einschlußexperimente und die Metachromasie wurden zur Klärung der Fragen angewandt.

1.4. Anwendungen für natürliche und synthetische Vesikeln

Die Anwendungsmöglichkeiten für natürliche und synthetische Vesikeln sind in der Prognose vielfältig.

1. Drug-Carrier in der Medizin

Arzneimittel lösen normalerweise immunologische Abwehrreaktionen im Körper aus, z.B. bewirken Proteine Antigen-Antikörper-Wechselwirkungen; daher scheint der Einschluß von solchen Verbindungen in Vesikeln sinnvoll. Peptide und artverwandte Substanzen können nicht oral eingenommen werden, da sie den Magen-Darm-Trakt wegen der Hydrolyse nicht unzersetzt passieren können. Das Insulin muß wegen der Hydrolyse oral in hohen Dosen verabreicht werden, was zu unerwünschten Nebenerscheinungen führen kann. Als Transportvesikeln bieten sich hier Vesikeln aus Phospholipiden oder oberflächenspezifizierte Phospholipidvesikeln an. J.D.Baldschwieler et al. ¹⁰ konnten zeigen, daß Mischvesikeln aus Distearylphosphatidincholin und modifizierten Zuckerlipiden die Aufnahme von Pharmaka in bestimmte Gewebe und Organe begünstigen.

2. Einschluß von Duft- und Aromastoffen

In der Waschmittel- und der Kosmetikindustrie könnten Vesikeln als Schutzhülle für empfindliche, leicht oxidierbare Verbindungen verwendet werden. Vesikeln aus Dimersäure ⁸ scheinen für einen technischen Einsatz geeignet zu sein, da sie relativ billig gewonnen werden können.

3. Einsatz bei der Entölung von Erdöllagerstätten

Vesikelbildner können auch als Detergentien und Aufschlämmer bei der Entölung von Erdöllagerstätten eingesetzt werden. So beschreiben F.Wagner et al. ¹¹ ein Trehaloselipid, das die Grenzflächenspannung zwischen Erdöl und Wasser drastisch herabsetzt, so daß es zum Tensidfluten Verwendung finden kann.

4. Organisation komplexer Reaktionssysteme ¹²⁻¹⁶

Durch den selektiven Einschluß von Substraten in die verschiedenen Regionen der Vesikeln sind diese zur Organisation von komplexen Reaktionssystemen prädestiniert. Ansätze in dieser Richtung sind gemacht.

5. Metallchelatherapie ¹⁷

2. Hydrophobe Gerüste -Makrotetrolide-

2.1. Syntheseprobleme bei der Darstellung von makrocyclischen Verbindungen

Makrocyclische Ringsysteme bilden eine große Klasse chemischer Verbindungen. Viele Naturstoffe enthalten makrocyclische Lactone, z.B. das Erythromycin. Die synthetischen Kronenether und Kryptanden sind weitere Vertreter dieser Klasse.

Solche Systeme lassen sich nach mehreren Methoden synthetisieren. Depolymerisation ¹⁸, Ringerweiterung ¹⁹, Ringschluß mit Hilfsbindung ²⁰ und vor allem die Cyclisierung von langen bisfunktionellen Edukten durch Verknüpfung der Enden ²¹.

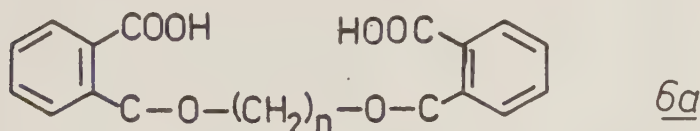
Vernünftige Ausbeuten an Makrocyclen zu erzielen, bereitet im Labor Schwierigkeiten. Bisfunktionelle Edukte können sowohl inter- als auch intramolekular abreagieren, so daß in der Regel die gewünschten cyclischen Verbindungen nur als Nebenprodukte entstehen. Konkurrenzreaktionen sind Oligomerisierung und Polymerisation.

Die Cyclisierung erfordert bestimmte Schutzvorkehrungen. Es hat sich als vorteilhaft erwiesen in hoher Verdünnung zu arbeiten, um die Reaktionsgeschwindigkeit der intermolekularen Reaktion herabzusetzen.

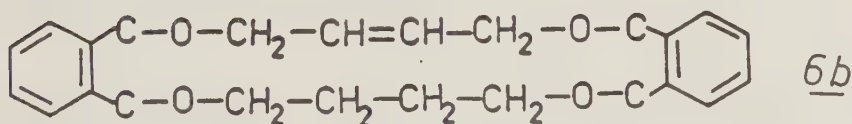
Man kennt auch ringschlußfördernde Effekte. Der "Template"-Effekt ²² und der "rigid-unit"-Effekt ²³ sind hier aufzuführen. Pedersen ²⁴ veröffentlichte 1967 seine sogenannten "Kronenethersynthesen". Die Ausbeuten der aus Ethylenglycol-einheiten aufgebauten Ringsysteme waren wegen des bei der Reaktion wirkenden "Template"-Effektes anorganischer Kationen (z.B. K^+) unerwartet hoch.

Die Tendenz der Ringbildung ist auch abhängig von der Beweglichkeit der kettenförmigen Moleküle. Die freie Drehbarkeit um Einfachbindungen wirkt sich normalerweise hinderlich für die Cyclisierung aus. Der Ersatz von Methylengruppen durch "starre" Phenyl- oder Vinylgruppen muß eine Steigerung der Ringbildung bewirken. Drews ²⁵ stellte aus dem Natriumsalz der Maleinsäure und Alkindibromiden C_{20} - und C_{24} -Cyclen her. Beide Ausgangsstoffe enthalten "starre" Elemente. Aus der zweistufigen Synthese von Phthalsäuretetroliden ²⁶ ist die Syn-

these der hier beschriebenen Maleinsäuretetrolide abgeleitet. Phthalsäureanhydrid und α,ω -Diole können quantitativ zur Verbindung 6a umgesetzt werden. Die Ausbeute nach dem Ringschluß lag jedoch bei allen Produkten unter 10%. Die Begünstigung der Ringbildung durch den Einsatz "starrer" Gruppen innerhalb der Kette ist deutlich beim Makrotetrolid 6b erkennbar. Diese Verbindung konnte mit einer Ausbeute von 31,7% isoliert werden.



$$n=2,4,5,6,8,10,12$$



Maleinsäure und α,ω -Diole - meist Ethylenglycol - sind in der Industrie bisher zur Herstellung von Polyestern und Alkydharzen verwendet worden ²⁷. Die dort angestrebte Polymerisation erfolgte beim Arbeiten ohne Lösungsmittel. Führt man die Reaktion dagegen in hoher Verdünnung aus (molares Verhältnis 1:250) so können aus Maleinsäureanhydrid (MSA) und langkettigen Diolen, wie 1,10-Decandiol 7, 1,12-Dodecandiol 8 und 1,16-Hexadecandiol 9, Makrocyclen hergestellt werden. Die einstufige saure Veresterung von MSA und 8 mit konzentrierter Schwefelsäure oder p-Toluolsulfonsäure als Katalysator liefert bei der Umsetzung in Benzol oder Toluol das Makrotetrolid 10 in 1-10% Ausbeute. Das Anhydrid besitzt gegenüber der Maleinsäure den Vorteil, daß die Synthese auch zweistufig gefahren werden kann. Die nichtkatalysierte Umsetzung von MSA und 8 liefert in guter Ausbeute den Diester 11. Aus dem Diester kann durch weitere sauer katalysierte Veresterung der Tetraester 10 in 40%iger Ausbeute gewonnen werden (siehe Abb.5). Die selektive Isolierung des gewünschten Tetrolids 10 aus dem Reaktionsgemisch

bereitet keine Schwierigkeiten. Das Produkt 10 kann in guter Reinheit durch einmaliges Umkristallisieren aus Essigester abgetrennt werden. 55

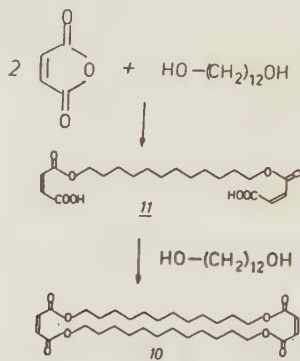
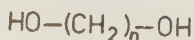
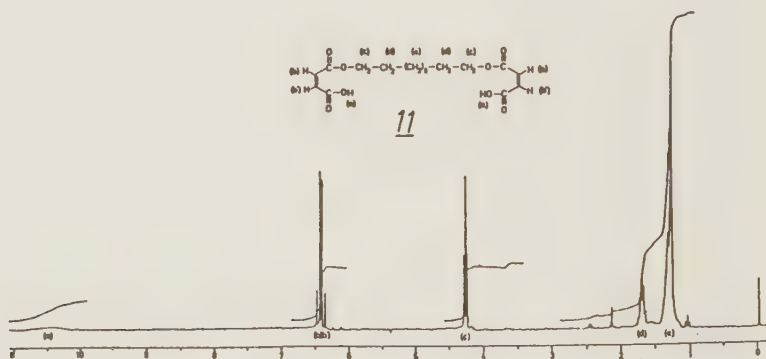


Abb.5: Reaktionsschema zur Synthese von makrocyclischen Estern (Makrotetrolide) aus MSA und α,ω -Diole dargestellt am Beispiel der Verbindung 10.

Zur Charakterisierung der Produkte 10 und 11 sind die ^1H -NMR-Spektren in Abb. 6a und 6b wiedergegeben.



$$n = \frac{10}{7}, \frac{12}{8}, \frac{16}{9}$$

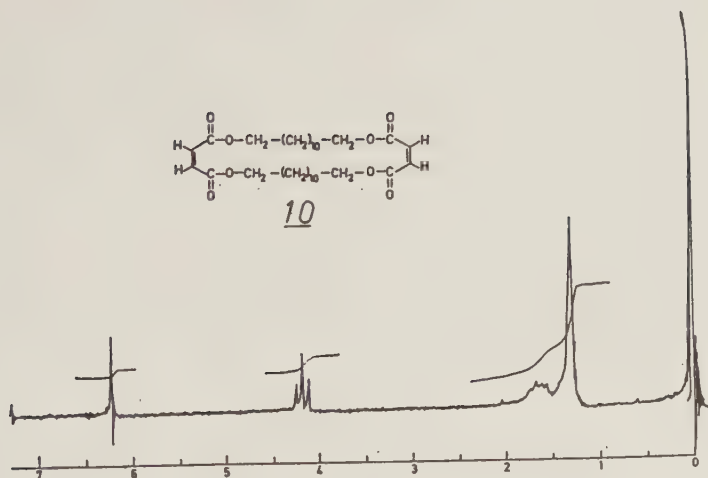
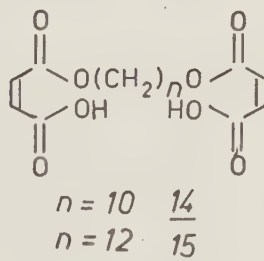
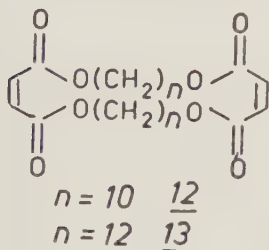


Abb. 6a: ^1H -NMR-Spektrum des Diesters 11 in $\text{DMSO}-d_6$ (270 MHz).
 6b: ^1H -NMR-Spektrum des Tetraesters 10 in CDCl_3 (100 MHz).

Mit den Diolen 7 und 9 lassen sich nach dem gleichen Verfahren die Maleinsäuretetrolide 12 und 13 in vergleichbaren Ausbeuten gewinnen. Als Zwischenstufen treten hier die Diester 14 und 15 auf.



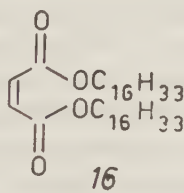
Durch alkalische Hydrolyse in Methanol kann ein großer Teil des nicht zum Tetrolid 10 umgesetzten 1,12-Dodecandiols 8 wieder zurückgewonnen werden. Nach Aufarbeitung und Umkristallisieren aus Ethanol/Wasser (8:2) erhält man reines, einheitliches Diol mit dem Schmelzpunkt 80-81°C. Das so gewonnene Diol ist reiner als das käufliche Produkt (Fa.Merck).

Die Vorteile des Diesters 11 liegen auf der Hand. Er gibt die unmittelbare Konformation des zu bildenden Tetrolids 10 vor. Diese Teilstruktur begünstigt durch van-der-Waalsche Kräfte und hydrophobe Wechselwirkungen die Anlagerung eines zweiten Diolmoleküls parallel zum ersten und der Ringschluß ist begünstigt.

Eine wichtige Voraussetzung für die Darstellung der Makrotetrolide ist die Zugänglichkeit von α,ω -Diolen oder α,ω -Dibromiden. Im Rahmen dieser Arbeit interessieren nur die Diole. Diese Diole können aus den entsprechenden Dicarbonsäuren nach Organic Syntheses 28 durch Veresterung und anschließende Reduktion mit Natrium hergestellt werden. Die Ester als Zwischenstufen sind noch relativ gut destillierbar. Die Diole lassen sich aus Ethanol umkristallisieren und besitzen größere Reinheit als die käuflichen Produkte. 1,16-Hexadecandiol 9 stellt man zweckmäßigerweise durch direkte Reduktion der Dicarbonsäure mit Lithiumaluminiumhydrid in THF 29 her. Die Ausbeuten in beiden Verfahren sind gut (siehe Experimenteller Teil 7.1.1.1. und 7.1.1.2.).

Für vergleichende Betrachtungen zwischen doppelschichtigen Vesikelbildnern und monoschichtigen Amphiphilen wurde als hydrophobes Gerüst ein Maleinsäuredihexadecylester 16 synthetisiert. Zur Darstellung langkettiger Maleinsäuredialkylester 30 sind in der Literatur mehrere Verfahren beschrieben. Bei allen Verfahren müssen bestimmte Parameter eingehalten werden, wenn man sterisch reine Dialkylmaleate erhalten will. Zu hohe Umsetzungstemperaturen begünstigen die thermische Isomerisierung zu den entsprechenden Fumarsäureestern. Die Bildung von Monoalkylestern wird unterdrückt, wenn man mit einem Überschuß an Alkohol arbeitet. Als beste Methode hat

sich die sauer katalysierte Veresterung von MSA mit 3 mol Hexadecanol in großem Überschuß an Benzol bei leichtem Rückfluß des Lösungsmittels erwiesen. Bei 80°C und Reaktionszeiten von 6–8 Stunden liegen die Ausbeuten an reinem Maleinsäuredihexadecylester 16 nach zweimaligem Umkristallisieren aus Aceton/Methanol bei 90% ³¹. Die Reaktion kann dünnsschichtchromatographisch im Lösungsmittelgemisch Benzol/Dioxan/Eisessig 90:25:4 ³² verfolgt werden. Nach 8 Stunden zeigt das Chromatogramm die Einheitlichkeit des Diesters 16 an (zur weiteren Charakterisierung siehe Kapitel 7.1.2.).



Als Beleg für die Reinheit der Substanz ist hier das ¹H-NMR-Spektrum der Verbindung 16 in CDCl₃ angeführt (Abb.7).

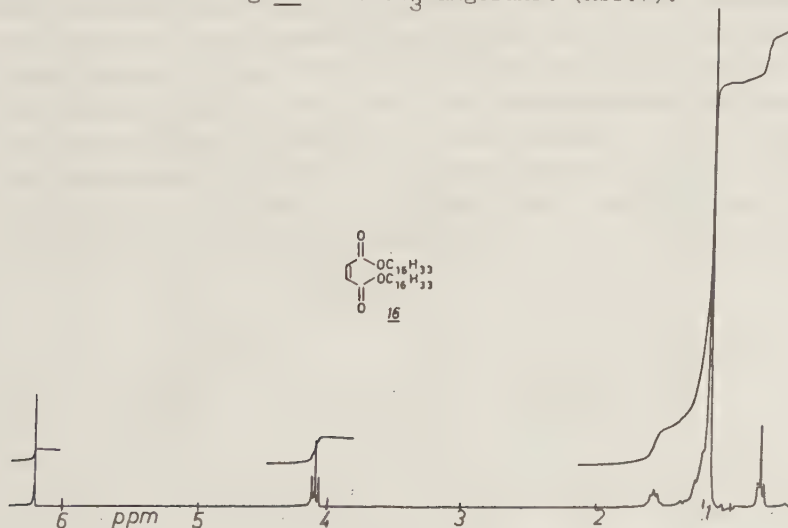
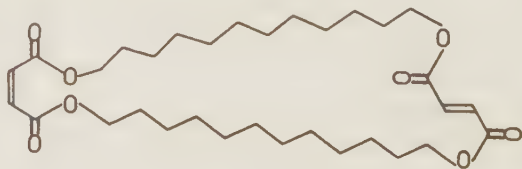


Abb. 7: ¹H-NMR-Spektrum des Maleinsäurediesters 16 in CDCl₃ (270 MHz)

2.2. Photochemische und thermische Umlagerungen des 1,6,19,24-Tetraoxa-cyclohexatriaconta-3,21-dien-2,5,20,23-tetrone (10)

Über die Umlagerung stereoisomerer ungesättigter Verbindungen durch Halogene im Sonnenlicht hat J. Wislencius schon 1897 im Chemischen Zentralblatt berichtet. Es gelang ihm Maleinsäure in Fumarsäure umzulagern ³³. Eggert ³⁴ untersuchte die Umlagerung bei Bestrahlung mit UV-Licht. Es stellt sich ein Gleichgewicht zwischen E- und Z-Form ein.

Die photochemische Umlagerung des Maleinsäuremakrotetrolids 10 mit Spuren Bromwasser in Benzol führt zu unterschiedlichen Gleichgewichten zwischen E,E-, E,Z- und Z,Z-Form in Abhängigkeit von der Bestrahlungsdauer. Sehr langes Bestrahlen mit UV-Licht von z.B. 5 Stunden verschiebt das Gleichgewicht auf die Seite der eingesetzten Z,Z-Form 10. Sie kann in 70%iger Ausbeute wieder isoliert werden. Kürzere Bestrahlungszeiten von 1 Stunde ergeben ein Gleichgewicht, das sich zu etwa gleichen Teilen aus den 3 Formen zusammensetzt. Aus dem Gleichgewichtsgemisch kann die E,Z-Form 17 durch präparative Schichtchromatographie an silbernitrathaltigen Kieselgelplatten isoliert werden ³⁵. Als Laufmittel verwendet man Chloroform/Eisessig 99:1. Für die Trennung ist vor allem die Art und die Zahl der Doppelbindungen maßgebend. Das Verfahren wurde entwickelt zur Zerlegung isomerer ungesättigter Glyceride, wie z.B. 1- und 2-Oleodistearin oder 1- und 2-Linoleodistearin. Die Auftrennung beruht vermutlich auf der Bildung von Silberkomplexen der ungesättigten Verbindungen ³⁶.



17

Die Isomerisierung des Maleinsäuremakrotetrolids 10 kann im ^1H -NMR-Spektrum und im IR-Spektrum gut verfolgt werden. Aus Vergleichsspektren ³⁷ von Maleinsäure- und Fumarsäurediethylester erkennt man, daß die Doppelbindungsprotonen für die E-Form bei 6,8 ppm und für die Z-Form bei 6,3 ppm in der δ -Skala auftauchen. Die Z,Z-Form 10 und die E,E-Form 18 bilden Singulett für die Protonen an der Doppelbindung. Bei der E,Z-Form 17 kommt es zur Aufspaltung der E-Protonen zum Duplett mit $J_{\text{H,H}} = 3\text{Hz}$. Aufgrund der geringeren Symmetrie in der E,Z-Form 17 werden auch die CH_2 -Gruppen, die direkt an den Esterbindungen sich befinden vom Triplet zum Multiplett aufgespalten.

Diesen Sachverhalt soll eine Zusammenstellung der ^1H -NMR-Spektren der drei Formen verdeutlichen. In Abb.8 sind die Teilspektren der Photoisomerisierungsprodukte 10, 17 und 18 im Bereich 4 bis 7 ppm aufgeführt.

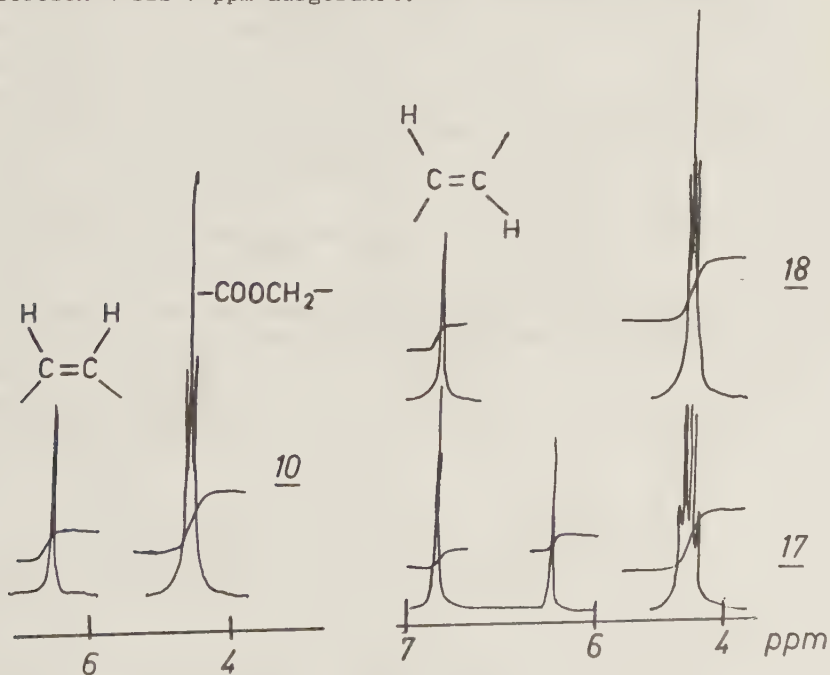


Abb.8: ^1H -NMR-Teilspektren der Photoisomerisierungsprodukte 10, 17 und 18 in CDCl_3 (270 MHz).

Ein Vergleich der IR-Spektren der Photoisomerisierungsprodukte bezüglich der -C=C- -Valenzschwingung zeigt auf, daß die -C=C- -Valenzschwingung bei der Z,Z-Form 10 eine starke Bande liefert, während die E,E-Form 18 nur eine sehr schwache Bande aufweist. In der E,Z-Form 17 ist die -C=C- -Valenzschwingungsbande weniger stark ausgeprägt als im Spektrum der Z,Z-Form 10.

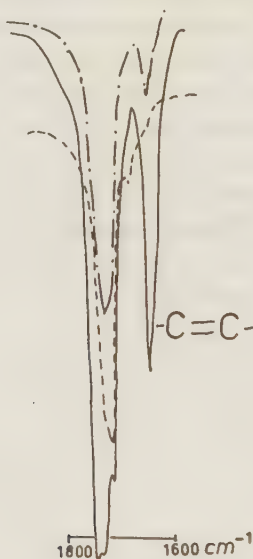


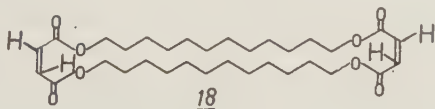
Abb.9: Vergleich der -C=C- -Valenzschwingungsbanden der Photoisomerisierungsprodukte 10, 17 und 18.

Durch thermische oder katalytische Isomerisation wird die Maleinsäure fast quantitativ in die schwerlösliche Fumarsäure umgewandelt. Die thermische Umlagerung ³⁸ benötigt hohe Temperaturen. So lagert sich z.B. Maleinsäure bei mehrtägigem Erhitzen ohne Lösungsmittel auf 100°C vollständig in Fumarsäure um. Die thermische Umlagerung unter dem Einfluß von Katalysatoren verläuft fast quantitativ bei 60°C. Als Katalysatoren wurden verschiedene Systeme vorgeschlagen: Mineralsäuren, z.B. HCl ³⁹, Schwefelverbindungen, wie Thiocyanate, Thiazole, Thiosemicarbazide und Thioharnstoffe; Bromverbindungen zusammen mit Peroxiden, z.B. Persulfat ⁴⁰. In der Praxis wird Thioharnstoff am häufigsten verwendet ⁴¹.

Die thermische Isomerisierung von der Z,Z-Form 10 des Maleinsäuremakrotetrolids bei 80°C in Ethanol in Gegenwart von Piperidin und 2-Mercaptobernsteinsäure liefert in 100%iger Ausbeute die E,E-Form 18. Zur Charakterisierung der Verbindung 18 siehe Kapitel 7.2.2.

Die Z,Z-Form 10 und die E,E-Form 18 können durch zweimaliges Umkristallisieren in schönen glasklaren Kristallen gewonnen werden. Aus Essigester erhält man die Z,Z-Form 10 mit dem Schmelzpunkt 103,5°C. Die E,E-Form kann aus Methylethylketon oder Isopropanol/Wasser 4:1 umkristallisiert werden. Aus Methylethylketon ergeben sich Kristallplättchen, aus Isopropanol/Wasser bilden sich lange Nadeln. Der Schmelzpunkt beträgt 66-67°C.

Vorläufige Röntgenstrukturuntersuchungen ergaben, daß die Z,Z-Form 10 in einer dichten Packung der Ketten vorliegt und die E,E-Form 18 einen Hohlraum zwischen den Ketten eines Moleküls aufweist ⁴².



2.3. Bromaddition an die Maleinsäuretetrolide

Thermisch reagiert Brom nur sehr langsam und unvollständig mit der Doppelbindung des Maleinsäuredicetylestere 16. Photochemisch findet solche Addition rasch statt. Schon nach 15 Minuten ist die Reaktion beendet und die Lösung entfärbt. Durch die trans-Addition an die Z-Form 16 entstand das racemische Gemisch 20. Aus der E-Form 19 bildete sich die meso-Form 21. Aus dem Vergleich der ^1H -NMR-Spektren der bromierten Verbindungen 20 und 21 (siehe Abb.10) folgt, daß bei der Bromierung von 16 auch teilweise die meso-Form 21 entstand. Dies setzt eine stattgefundene Umlagerung in die E-Form 19 voraus.

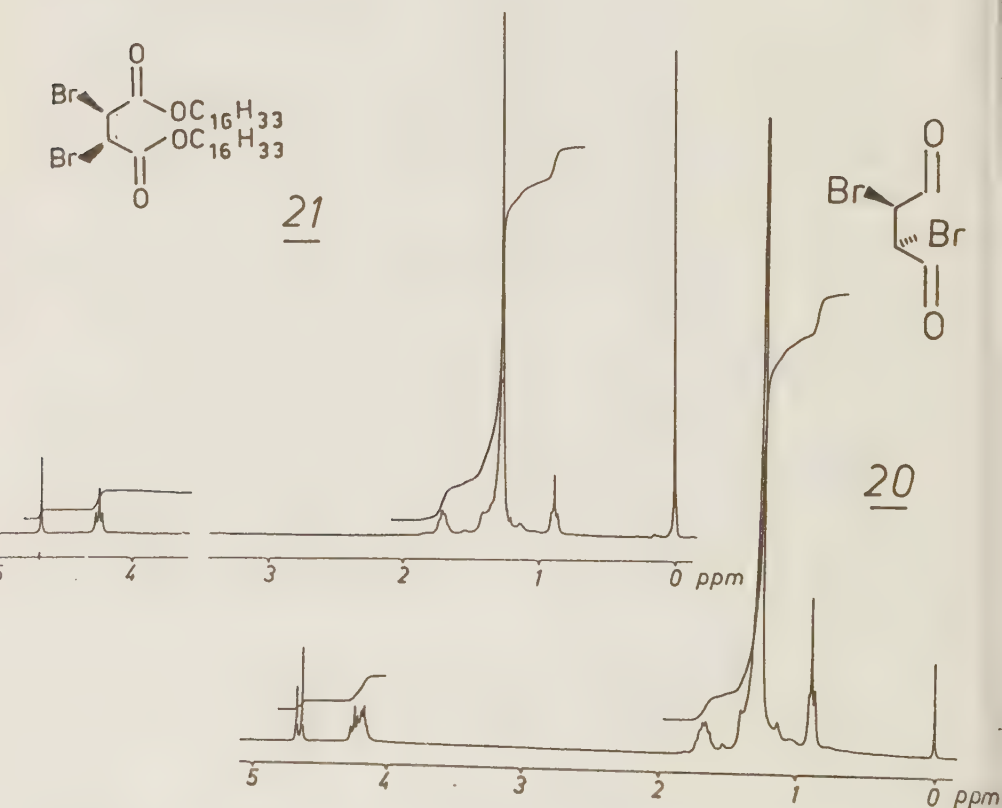
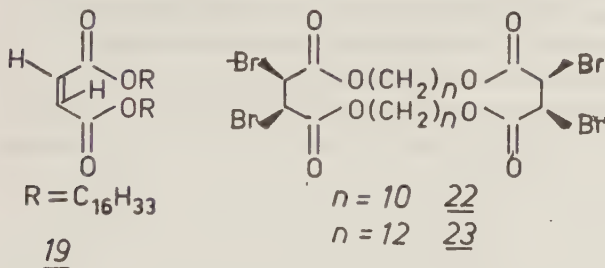


Abb.10: ^1H -NMR-Spektren der bromierten Verbindungen 20 und 21 in CDCl_3 (270 MHz).

Die photochemische Bromaddition an die Tetrolide 10 und 12 führt zu den Tetrabromverbindungen 22 und 23. Die bromierten Produkte können durch Umkristallisation in Methanol oder n-Decan gereinigt werden. Es bilden sich farblose Nadeln mit den Schmelzpunkten 75°C für 22 und 72°C für die Verbindung 23. Die Tetrabromverbindungen 22 und 23 laufen einheitlich auf Kieselgel und sind analysenrein. Im Massenspektrum der Verbindung 22 kann man das sukzessive Abspalten der Bromatome verfolgen (weitere Daten siehe Kapitel 7.3.).



Die bromierten Makrolide 22 und 23 wurden zur Herstellung schwarzer Lipidmembranen verwendet. Die Bromcyclen 22 und 23 sind in n-Decan bei erhöhter Temperatur gut löslich. Die Löslichkeit (etwa 1-2mg/ml) ist eine Voraussetzung für die Ausbildung der schwarzen Membran aus n-Alkandispersionen. Aus asymmetrischen Strom-Spannungskurven und spezifischen Kapazitäten lassen sich die Schichtdicken von Membranen ermitteln. An dem Tetraether 4 (siehe Seite 4) konnte mit diesen Messungen die Monoschichtigkeit der Membran ermittelt werden. Die Anwendung der Meßmethode auf den bromierten Cyclohexen 22 führte zu folgenden Ergebnissen ⁴³. Die Tetrabromverbindung 22 bildet bei Temperaturen bis 40°C einen Propfen auf dem Teflonloch, der aber im wesentlichen kristalline Fragmente enthält. Im Mikroskop sind vielschichtige, flächig ausgebildete Bereiche und kristalline Fragmente zu erkennen. Eine Erhöhung der Temperatur auf 44°C führt zur Lösung der Kristalle, die Membran dünnt sich aus, ist aber noch immer vielschichtig. Man mißt bei dieser Temperatur Widerstände von 10^6 Ohm über eine Fläche von 0,64 mm². Bei 50°C

bildet sich eine schwarze Membran aus, die gegen 0,1M KCl, 5mM Hepes pH 7 über Minuten stabil ist. Die gemessene Kapazität korreliert aber eher mit einer doppelschichtigen Membran.

Eine Erklärung dafür, daß der bromierte Cyclus 22 keine monoschichtigen Membranen ausbildet, könnte in dem schlecht ausgeprägten amphiphilen Charakter der Verbindung 22 liegen. Man hat hier kein Amphiphiles mit wasserlöslicher Kopfgruppe. Eine andere Schwierigkeit könnte darin bestehen, daß der Bildungsmechanismus der schwarzen Membran das Vorhandensein von Doppelschichten oder eine bestimmte Dicke der monoschichtigen Amphiphile voraussetzt.

3. Doppelschichtmembranen aus Succinatester-Amphiphilen

3.1. Michael-Addition von schwefelhaltigen Nucleophilen an den Maleinsäuredihexadecylester 16

Neben den in den Kapiteln 4.1. und 4.2. beschriebenen monoschichtigen Bolaamphiphilen wurden auch BLM-Vesikelbildende Amphiphile hergestellt.

Die Synthese dieser Verbindungen erfolgte aus folgender Motivation:

1. Sie können als Vergleichssubstanzen wertvolle Hinweise für geeignete Reaktionsbedingungen zur Synthese von Bolaamphiphilen erbringen. Durch den Vergleich der spektroskopischen Daten wird die Struktur der MLM-Vesikelbildner weiter abgesichert. Da beide Gruppen von Amphiphilen die gleichen Kopfgruppen und ähnliche hydrophobe Gerüste besitzen sind Vesikel aus ihnen bezüglich Stabilität, Einschluß von Substraten und Verhalten gegenüber Detergentien direkt vergleichbar.
2. Sie sind schneller in größeren Mengen zugänglich, da der Maleinsäuredihexadecylester 16 in großen Mengen problemlos hergestellt werden kann.
3. Für die Charakterisierung der unsymmetrischen MLM-Vesikel (siehe Kapitel 6.2.) mit dem metachromatischen Effekt lieferten das Sulfobernsteinsäureamphiphil 24 und das Thiobernsteinsäureamphiphil 25 die Grundlagen für die selektive Titrierbarkeit der Carbonsäure- und Sulfonsäuregruppe.

Die Anlagerung von Mercaptoverbindungen an α, β -ungesättigte Fettsäureester führt zu β -substituierten Produkten. Der Mechanismus der Michael-Addition ist in der Abb. 12 dargestellt. Die Reaktion kann durch Bestrahlen des Reaktionsgemisches oder durch Peroxid beschleunigt werden; dabei tritt jedoch als Konkurrenzreaktion unter Umständen Dimerisierung oder Polymerisierung der ungesättigten Verbindung ein. M.S. Kharash und C.F. Fuchs 44 fanden, daß ein Gemisch von Mercaptan und Acrylsäuremethylester beim Bestrahlen mit UV-Licht neben dem zu erwartenden monomeren β -Additionsprodukt zwei Verbindungen entstehen, die auf ein Molekül Mercaptan zwei bzw. drei Mole-

küle der ungesättigten Verbindung enthalten.

Für die Addition des Mercaptans an den ungesättigten Ester in Gegenwart einer Base, wie Trimethylbenzylammoniumhydroxid, Piperidin oder Natriumalkoholat diskutieren sie einen ionischen Mechanismus:

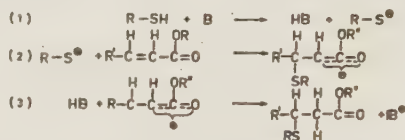


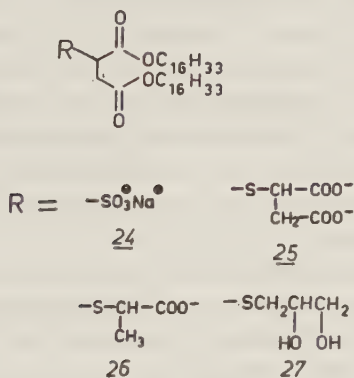
Abb.12: Reaktionsmechanismus für die β -Addition von Mercaptoverbindungen an α, β -ungesättigte Ester.

Die durch Basen katalysierte Umsetzung verläuft mit besseren Ausbeuten und wird deshalb der radikalischen Reaktion vorgezogen. Die Ausbeuten liegen meistens um 90% der Theorie. Auch in wäßrig-alkalischer Lösung tritt leicht Addition an die α, β -ungesättigte Säure ein. Diese Methode ist besonders dann angebracht, wenn Thioetherdicarbonsäuren hergestellt werden sollen. So werden Cystein und Thioglycolsäure bei einem durch Natronlauge eingestellten pH = 7,4 an Maleinsäure addiert ⁴⁵.

In einer Reihe von Beispielen untersuchten A.Schöberl et al. ⁴⁶ die Additionsfähigkeit von Mercaptocarbonsäuren an Acrylsäureester. Sie fanden dabei, daß die Anlagerung optimal bei einem pH wenig über 7 erfolgt. Diese Ergebnisse wurden bestätigt durch die Feststellung, daß sich Thioglycolsäure an Maleinsäureester addiert.

Diese Umsetzungen wurden analog auf den Maleinsäuredihexadecylester 16 übertragen. An die Doppelbindung der Verbindung 16 können also Nucleophile sich in einer Michael-Addition anlagern. Die Doppelbindung kann sowohl durch Stickstoff- als auch durch Schwefelnucleophile aufgelöst werden ⁴⁷. Amine besitzen den Nachteil, daß sie neben der Anlagerung auch eine Umsetzung der Ester zu den Amidn bewirken. Als besonders nützlich haben sich dagegen Nucleophile, wie Mercaptoessigsäure, Mercaptobernsteinsäure, Mercaptopropionsäure, Mercaptopropandiol und Natriumhydrogensulfit erwiesen. Die Einführung dieser schwefelhaltigen Kopfgruppen zu den Succinatesteramphiphilen

ist im Schema 1 enthalten.



Schema 1: Schwefelhaltige Kopfgruppen in den doppelschichtigen Succinatester-Amphiphilen.

Die Reaktionsbedingungen für die Einführung der hydrophilen Kopfgruppen sind im folgenden Abschnitt beschrieben.

Die Säuren werden zuerst neutralisiert, denn die Salze addieren sich besser als die freien Säuren. Die Reaktion wird in Iso-propanol/Wasser (4:1) oder in Ethanol ausgeführt. Als Katalysator wurde Piperidin verwendet. Die Ausbeuten liegen zwischen 68 und 88%. Die Produkte können durch Umkristallisieren oder durch Auswaschen der Edukte gereinigt werden. Nähere Angaben sind im Kapitel 7.4.1. - 7.4.4. enthalten.

Die IR-Spektren zeigen neben den charakteristischen Banden für das hydrophobe Gerüst, die Frequenzen der Kopfgruppen, z.B. für die COO^- -Gruppe bei 1592 cm^{-1} und 1415 cm^{-1} in der Verbindung 25, dem Thiosuccinataddukt. Die ---C=C--- Valenzschwingung ist verschwunden.

Die ^1H -NMR-Spektren weisen neben den Piks der Kettenprotonen die durch die Addition entstandenen ABX-Systeme der mono-substituierten Bernsteinsäurederivate 48 auf (siehe dazu Kapitel 4.3.), sowie die restlichen Kopfgruppenprotonen. Im Falle des Thiosuccinatadduktes 25 tritt auch in der Kopfgruppe ein weiteres ABX-System auf, so daß im Spektrum mehrere Multipletts auftauchen, die aber durch Vergleich der chemischen Verschiebungen von dem Addukt von 2-Mercaptobernsteinsäure an Maleinsäure und der 2-Mercaptobernsteinsäure allein zugeordnet werden können (siehe dazu auch Kapitel 4.3.).

Das Thiolactataddukt 26 besitzt zwei Asymmetriezentren im Molekül. Es existieren also vier Stereoisomere. Im ^1H -NMR-Spektrum der Verbindung 26 sind die beiden Diastereomeren deutlich zu unterscheiden. Im Spektrum führt dies zu einer Verdoppelung der Signale für die Protonen a,b,c,d,e und f. Die chemischen Verschiebungen der beiden Diastereomeren sind um etwa 0,1 ppm gegeneinander verschoben. In der Abb.13 ist dieser Sachverhalt dargestellt.

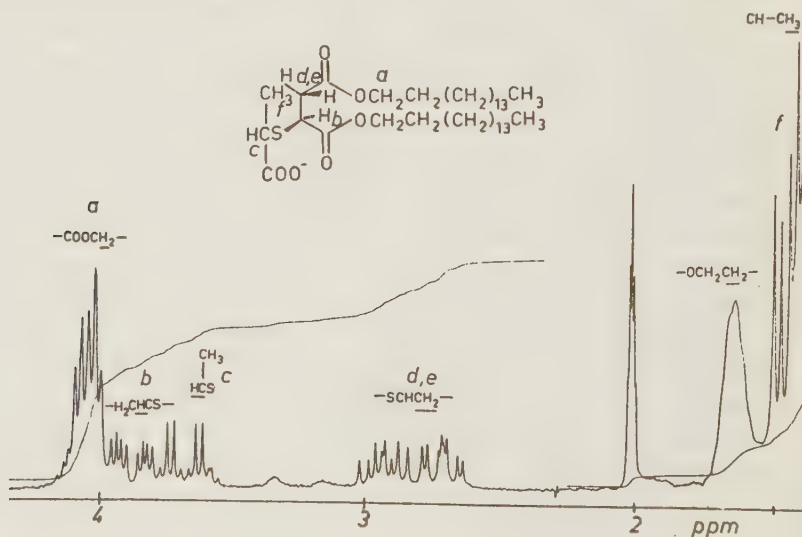


Abb.13: ^1H -NMR-Spektrum des Diastereomerenpaares von dem Thiolactataddukt 26 in CD_3COOD (270 MHz).

Es läßt sich vermuten, daß das Diastereomerenpaar des Thio-lactatadduktes 26 analog einer Untersuchung von H.H.David ⁴⁹ an einem Thioglucoseaddukt durch Umkristallisation in Methanol getrennt werden könnte. Diese Untersuchung wurde aber nicht durchgeführt.

Die Massenspektren dieser Verbindungen lieferten meistens nur die hydrophoben Gerüste als Piks höchster Masse. Die Verbindungen ergaben befriedigende Elementaranalysen.

Die Einführung einer neutralen Kopfgruppe durch die Addition von 3-Mercapto-1,2-propandiol ergibt das Amphiphil 27, daß bei 45-46°C schmilzt. Die Reaktion wird in Isopropanol unter Piperidin-Katalyse ausgeführt. Das Amphiphil läuft einheitlich auf Kieselgel in Chloroform/Methanol 5:1. Im IR-Spektrum finden sich neben den Schwingungen für das hydrophobe Gerüst vor allem OH-Valenz- und Deformationsschwingungen bei 3400 cm⁻¹ und 1415 cm⁻¹. Im ¹H-NMR-Spektrum stimmen die Verhältnisse zwischen Kopf- und Kettenprotonen. Im Massenspektrum ist der Molpik mit geringer Intensität zu finden.

Das Sulfoaddukt 24 und das Thiosuccinataddukt 25 wurden vor allem für die Untersuchung des metachromatischen Effektes von Acridinorange und Methylenblau verwandt (siehe Kapitel 6.2.). Mit dem Dioladdukt 27 wurden temperaturabhängige ¹H-NMR-Untersuchungen an Vesikellösungen durchgeführt (siehe Kapitel 6.5.). Außerdem wurden mit diesen drei Amphiphilen Versuche zur Ausbildung von schwarzen Membranen unternommen (siehe Seite 19). Aus diesen Untersuchungen ergab sich, daß nur daß Dioladdukt 27 bei 50°C eine schwarze Membran ausbildet, die aber nicht lange genug stabil bleibt, um verlässliche Messungen zu machen. Das Sulfoaddukt 24 und das Thiosuccinataddukt 25 bilden keine schwarze Membranen aus, es sind nur kristalline Strukturen zu erkennen. Die starken Abstoßungskräfte der geladenen Kopfgruppen scheinen ein Schmelzen und Ausdünnen der Membran zu verhindern. Die Wechselwirkungskräfte der Kopfgruppen in den Diol-Amphiphilen 27 sind herabgesetzt und scheinen denen der zwitterionischen Kopfgruppen, wie sie in Lecithinen auftreten, eher zu entsprechen.

Für Versuche zur Anlagerung von Sulfinsäuren sind die Arylsulfinsäuren vorzuziehen, da sie stabiler sind als die aliphatischen Sulfinsäuren. Die Sulfinsäuren lassen sich leicht darstellen, sind gut isolierbare, aber unbeständige Verbindungen. In Gegenwart von Wasser disproportionieren sie zu Sulfonsäuren und Sulfensäuren. Die Darstellung verläuft besonders gut über die Reduktion der entsprechenden Sulfonsäureverbindungen ⁴⁹. Sulfinsäuren addieren nach DRP 676013 von 1936 an Maleinsäure ⁵⁰. Die Reaktion wird in siedendem Wasser durchgeführt. Die Sulfinsäure addiert aus der Struktur II an die α, β -ungesättigte Verbindung ⁵¹. Die tautomeren Strukturen sind in Abb. 14 aufgeführt.

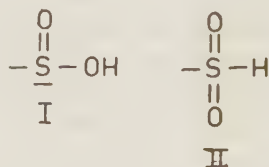
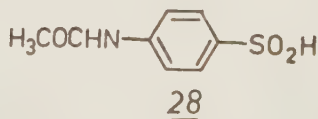


Abb.14: Tautomere Strukturen der Sulfinsäuregruppierung.

Als Sulfinsäurederivat wurde 4-Acetaminobenzolsulfinsäure ²⁸ verwendet, wegen der größeren Stabilität der aromatischen Sulfinsäuren. Es wäre nach der Abspaltung der Schutzgruppe eine freie Aminogruppe als hydrophile Kopfgruppe zugänglich gewesen; damit wären Bernsteinsäurederivate mit positiven Kopfgruppen erhalten worden.



4-Acetaminobenzolsulfinsäure wurde in einer zweistufigen Synthese nach Smiles und Berc ⁵² aus Acetanilid gewonnen. Acetanilid wurde mit Chlorsulfonsäure in das 4-Acetosulfonsäurechlorid überführt. Das Sulfonsäurechlorid wird mit Natriumsulfit reduziert und die freie Säure fiel beim Ansäuern mit 60%iger Schwefelsäure aus.

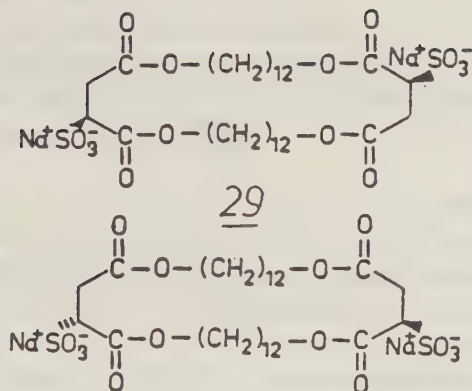
Die so dargestellte 4-Acetaminobenzolsulfinsäure 28 wurde durch IR, NMR- und Massenspektroskopie charakterisiert. Die Elementaranalyse bestätigt die Reinheit der Substanz. Im IR-Spektrum treten die charakteristischen Banden für Sulfinsäuren nach Weitkamp und Bart 53 auf ($\nu = 2790, 2450$ und 1085 cm^{-1}), sowie bei $\nu = 1040 \text{ cm}^{-1}$ die S=O-Valenzschwingung. Im Massenspektrum erscheint kein Molpik, aber charakteristische Fragmente, die eine Zuordnung zu einem para-disubstituierten Benzolderivat erlauben, zudem treten charakteristische Abspaltungen von Schwefel und Schwefeldioxid auf. Das ^1H -NMR-Spektrum in CD_3OD liefert ein AA',BB'-System mit para- und ortho-Kopplungen (weitere Daten siehe Kapitel 7.4.5.). Die Addition an den Maleinsäuredihexadecylester 16 in Ethanol/Wasser (1:1,5) gelang nicht. Der eingesetzte Ester wurde fast quantitativ zurückgewonnen. Es fand keine thermische Isomerisierung zum Fumarsäuredihexadecylester statt.

4. Synthese von MLM-Vesikelbildnern aus Maleinsäuretetroliden

4.1. Symmetrische Bolaamphiphile aus Maleinsäuretetroliden

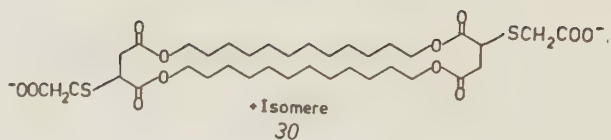
Die Maleinsäuretetrolide (siehe Kapitel 2.1.) bilden den Grundstock für eine große Palette von Amphiphilen. Bei der Synthese können verschiedene Parameter berücksichtigt werden. Entsprechend den eingesetzten Tetroliden kann die Länge des hydrophoben Gerüsts variiert werden. In dieser Arbeit wurden Bolaamphiphile mit C_{10} -, C_{12} - und C_{16} -Ketten hergestellt. Die Einführung der hydrophilen Kopfgruppen wurde analog zu den in dem Kapitel 3.1. beschriebenen Bedingungen gewählt. Es wurden die gleichen Schwefelnucleophile benutzt mit Ausnahme der 3-Mercaptopropionsäure. Es wurden also negativ geladene und neutrale Kopfgruppen eingeführt. Man kann monoschichtige oder doppelschichtige Vesikelbildner aus den Tetroliden gewinnen, je nachdem ob man an beide oder nur an eine Doppelbindung addiert.

Zur Charakterisierung der Bolaamphiphile bieten sich die gleichen spektroskopischen Methoden an, die die Struktur der doppelschichtigen Membranbildner belegen. Die gebildeten Bolaamphiphile können vor allem mit der 1H -NMR-Spektroskopie strukturell abgesichert werden. In den IR-Spektren finden sich Informationen über die hydrophilen Kopfgruppen. Die Amphiphile besitzen meist keine definierten Schmelzpunkte. Die Einheitlichkeit der Produkte kann mittels Elementaranalyse und dünnschichtchromatographisch überprüft werden. Als Laufmittel eignen sich Lösungsmittelgemische, wie Benzol/Dioxan/Eisessig 90:25:4 32 oder Wasser/Essigester/2-Propanol/Ammoniak 4:8:10:3 54. Isomere Amphiphile (Konstitutions- und Stereoisomere) ließen sich nicht dünnschichtchromatographisch trennen. Die Synthese des Sulfobernsteinsäuretetrolids 29 55 gelang unter den gleichen Bedingungen, wie bei der Darstellung des Sulfobernsteinsäuredihexadecylesters 24. Es sind vier Stereoisomere der Verbindung 29 zu erwarten. Die Enantiomeren lassen sich NMR-spektroskopisch nicht unterscheiden. Die Diastereomeren könnten eventuell mit dem NMR-Spektrum belegt werden.



Nach 5 Stunden Reaktionszeit wurde der Rückstand mit heißem Methanol extrahiert und anschließend zur Entfernung des restlichen Hydrogensulfits aus siedendem Wasser umkristallisiert. Das Sulfobernsteinsäuretetrolid 29 schmilzt bei 255-260°C. Die Reinheit der Substanz belegen die Schichtchromatographie an Kieselgel, die Elementaranalyse und das ^1H -NMR-Spektrum in $\text{DMSO}-d_6$. Die ABX-Systeme für die monosubstituierten Bernsteinsäurederivate liefern zwei Doppeldupletts bei $\delta = 2,77$ und $2,89$ ppm für den AB-Teil und ein Doppelduplett für den X-Teil bei $\delta = 3,66$ ppm (siehe dazu auch Kapitel 4.4). Aus dem Spektrum ist nicht zu entnehmen, ob nur ein Diastereomer vorliegt - und wenn ja, welches - oder ob es sich um ein Gemisch der beiden Diastereomeren handelt. Das IR-Spektrum des Sulfobernsteinsäureamphiphils 29 weist die erwarteten SO_2 -Deformationsschwingungen bei $\nu = 1230$ und 1055 cm^{-1} auf (weitere Daten siehe Kapitel 7.5.1.1.).

Die Umsetzung von dem Natriumsalz der 2-Mercaptoessigsäure mit den Maleinsäuremakrotetroliden 10, 12 und 13 führt zu den symmetrischen Bolaamphiphilen 30, 31 und 32. Die Reaktion wurde in Isopropanol/Wasser 4:1 bei pH 7-8 unter den üblichen Bedingungen ausgeführt. Die Ausbeuten für die Verbindungen 30 und 31 lagen bei 75%, während die Verbindung 32 nur in 32%iger Ausbeute isoliert werden konnte.



Die IR-Spektren der Thioacetat-Addukte 30, 31 und 32 weisen neben den Schwingungen für die hydrophoben Gerüste, die Banden für die COO^- -Gruppen bei $\nu = 1610$ und 1410 cm^{-1} , sowie die C-S-Schwingung bei 695 cm^{-1} , auf.

Die Protonenresonanzspektren in CD_3COOD entsprechen den Erwartungen. Die Signale für das Gerüst, für die ABX-Systeme und die AB-Systeme sind vorhanden (siehe dazu auch Kapitel 4.3. und die Kapitel 7.5.1.2. - 7.5.1.4.). In Abb.15 ist das NMR-Spektrum der Verbindung 32 abgebildet.

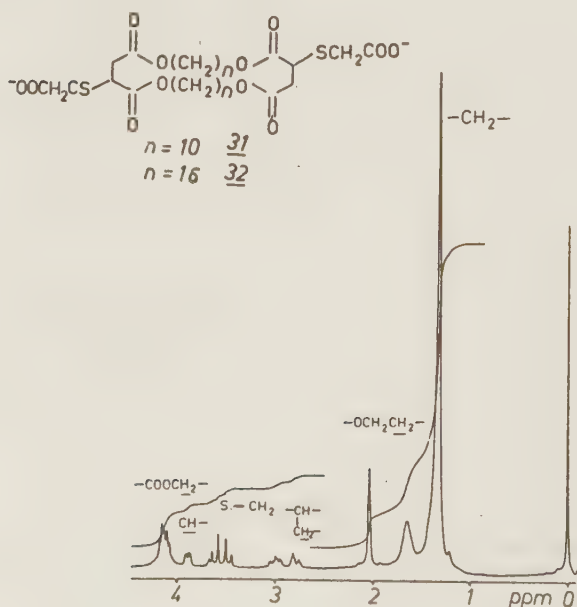
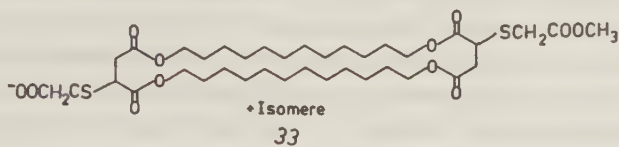


Abb.15: ^1H -NMR-Spektrum des Thioacetat-Adduktes 32 in CD_3COOD (270 MHz).

Die Elementaranalysen und die Dünnschichtchromatographie bestätigen die Reinheit der Substanzen.

Eine Derivatisierung des angesäuerten Thioacetatadduktes 30 mit etherischer Diazomethanlösung in Methanol/Wasser 10:1 lieferte den Monomethylester 33.



Die Bildung des Monomethylesters 33 läßt darauf schließen, daß das symmetrische Bolaamphiphil 30 in dem Lösungsmittelgemisch in der Weise aggregiert, daß nur die äußeren Kopfgruppen einer Umsetzung zugänglich sind. Die Reaktion an der äußeren Oberfläche läuft wegen der Aggregation nicht quantitativ ab. Der Monomethylester 33 kann gut mittels der Protonenresonanzspektroskopie nachgewiesen werden. Die chemische Verschiebung für die Methylesterprotonen ergibt sich zu $\delta = 3,74$ ppm als Singulett. Die Veresterung hat einen kleinen Einfluß auf das restliche Spektrum. Die Protonen der ABX-Systeme und der AB-Systeme sind um etwa 0,04 ppm gegeneinander verschoben. In der Abb.16 ist das NMR-Spektrum des Monomethylesters 33 dargestellt.

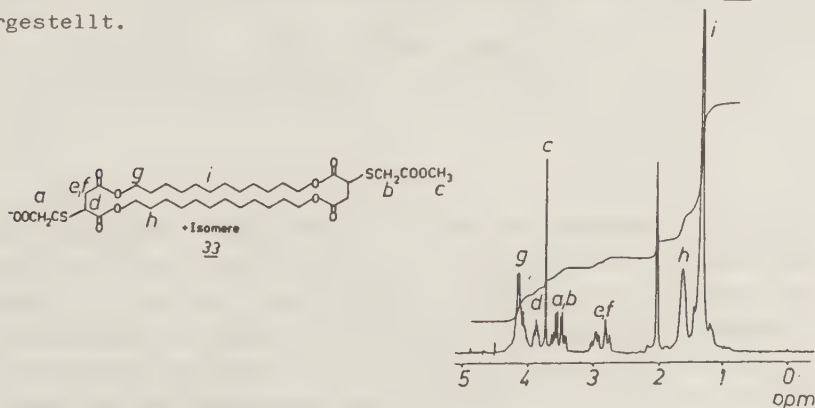


Abb.16: ^1H -NMR-Spektrum des Monomethylesters 33 in CDCl_3 (270 MHz).

Die Einführung von neutralen Kopfgruppen kann ebenfalls durch die Michael-Addition an das Maleinsäuremakrotetrolids 10 erfolgen. In Isopropanol addierte sich 3-Mercapto-1,2-propan-diol an das Tetrolid 10 in guter Ausbeute. Das neutrale Dioladdukt 34 schmilzt bei 82°C und läuft einheitlich auf der Dünnschichtplatte in Benzol/Dioxan/Eisessig 90:25:4. Im IR-Spektrum tauchen die charakteristischen OH-Valenzbanden für die hydrophilen Kopfgruppen auf. Das ^1H -NMR-Spektrum ist in Abb.17 wiedergegeben. Im Massenspektrum findet man den Molekül mit schwacher Intensität und das Fragment, in dem eine Diol-Kopfgruppe abgespalten wurde. Die befriedigende Elementaranalyse bestätigt die Reinheit der Substanz.

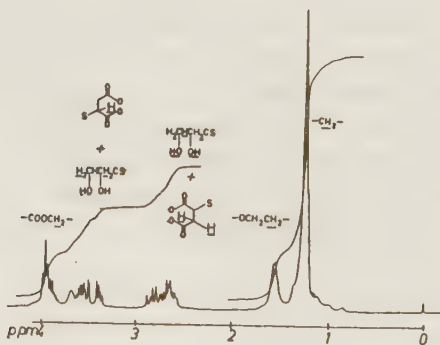
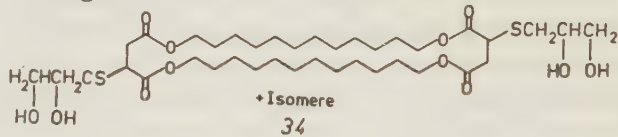
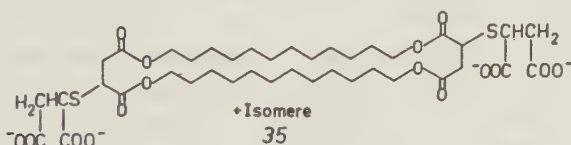


Abb.17: ^1H -NMR-Spektrum des Dioladduktes 34 in CDCl_3 (270 MHz). Ein weiteres symmetrisches Bolaamphiphil kann durch zweifache Anlagerung von 2-Mercaptosuccinat an das Tetrolid 10 in 65%iger Ausbeute gewonnen werden. Das Thiosuccinatderivat 35 ist relativ gut wasserlöslich, kann aber durch Ansäuern ausgefällt werden. Die Spektren und die Elementaranalyse sind in guter Übereinstimmung mit den erwarteten Daten (siehe dazu Kapitel

7.5.1.6).

Diese symmetrischen Bolaamphiphile (29 - 35) wurden hergestellt, um zu prüfen, ob die cyclischen Amphiphile für sich alleine zur Vesikelbildung befähigt sind oder ob es wie Kunitake ⁷ und Fuhrhop/Kaufmann ⁸ beschreiben des Zusatzes von "spacern" bedarf, damit symmetrische Bolaamphiphile Kurvatur erlangen. Elektronenmikroskopische Untersuchungen (siehe dazu Kapitel 6.1.) wurden dazu unternommen. Durch Einschlußexperimente sollten die Membranen weiter charakterisiert werden (siehe dazu vor allem Kapitel 6.3). Von dem Thioacetataddukt 30 wurden temperaturabhängige NMR-Spektren aufgenommen (siehe Kapitel 6.5.). Das Dioladdukt 34 wurde auf die Bildung schwarzer Membranen untersucht. Bei 50°C kommt es zwar zu der Ausbildung einer schwarzen Membran aus n-Alkandispersionen (siehe dazu Kapitel 2.3. und Seite 25), aber die Lebensdauer der schwarzen Membran ist leider für die asymmetrischen Strom-Spannungs-Messungen und zur Ermittlung der Kapazität der Membran zu kurz. Die Membran reißt innerhalb weniger Sekunden. Weitere Untersuchungen an symmetrischen Bolaamphiphilen sind im Kapitel 6. enthalten.



4.2. Unsymmetrische monoschichtige Bolaamphiphile

Es gibt zwei Synthesewege, um das unsymmetrische Amphiphil 38 zu erhalten. Die Reaktionsskizze in der Abb. 18 verdeutlicht die beiden Wege.

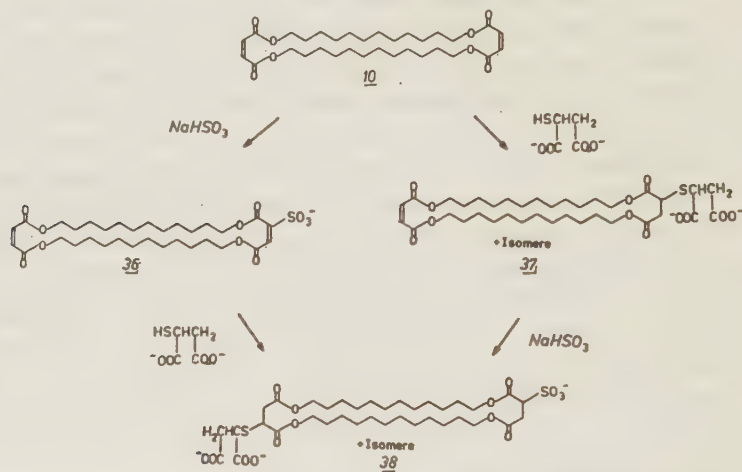


Abb.18: Reaktionsskizze für die Synthese der unsymmetrischen monoschichtigen Bernsteinsäureverbindung 38.

In der ersten Synthese wurde der Maleinsäuremakrocyclus 10 zuerst mit Natriumhydrogensulfit umgesetzt, das Monosulfoaddukt 36 isoliert und in einem zweiten Schritt mit 2-Mercapto-succinat umgesetzt. Beim zweiten Verfahren wurde zuerst mit dem Natriumsalz der 2-Mercaptobernsteinsäure zur Monothio-succinatverbindung 37 umgesetzt und anschließend Natriumhydrogensulfit addiert.

Das durch die Michael-Addition von Natriumhydrogensulfit an den Maleinsäurecyclus 10 entstandene Gemisch aus nichtumgesetzten Cyclus 10, Monosulfoaddukt 36 und Disulfoaddukt 29 kann durch die unterschiedlichen Löslichkeiten der Edukte/Produkte getrennt werden. Der Makrocyclus 10 wurde mit heißem Essigester herausgelöst. Monosulfoaddukt 36 und Disulfoaddukt 29 wurden durch Aufkochen in Aceton getrennt. Das Disulfoaddukt 29 ist in Aceton sehr schlecht löslich; das Monosulfoaddukt 36 ist in der Hitze löslich und fiel in der Kälte

wieder aus. Die Ausbeute an Monosulfoaddukt 36 betrug 30% der Theorie. Die Identifizierung des Monosulfoadduktes 36 erfolgt mit ^1H -NMR-Spektrum, IR-Spektrum und Elementaranalyse. Da sich Monosulfoaddukt 36 und Disulfoaddukt 29 in ihren C- und H-Gehalten stark unterscheiden, können die Addukte durch Elementaranalyse unterschieden werden.

Makrotetrolid <u>10</u>	68,06% C	9,28% H
Monosulfoaddukt <u>36</u>	57,45% C	8,00% H
Disulfoaddukt <u>29</u>	49,73% C	7,05% H

Das IR-Spektrum des Monosulfoadduktes 36 zeigt neben den charakteristischen Frequenzen für das hydrophobe Gerüst, Schwingungsbanden für die SO_3^- -Gruppe bei $\nu = 1240\text{ cm}^{-1}$ und 1055 cm^{-1} , sowie die -C=C- -Valenzschwingung bei $\nu = 1640\text{ cm}^{-1}$. Im ^1H -NMR-Spektrum erscheint das ABX-System und die Doppelbindungsprotonen bei $\delta = 6,45\text{ ppm}$ (siehe Abb.19). Aus allen diesen Angaben ist es abgesichert, daß die Monosulfoadditionsverbindung 36 entstanden ist. Im Gegensatz zu der im folgenden Abschnitt beschriebenen Umsetzung mit 2-Mercaptosuccinat zur Monothiosuccinatverbindung 37 fand mit Natriumhydrogensulfit keine Isomerisierung der freien Doppelbindung des Monosulfoadduktes 36 statt.

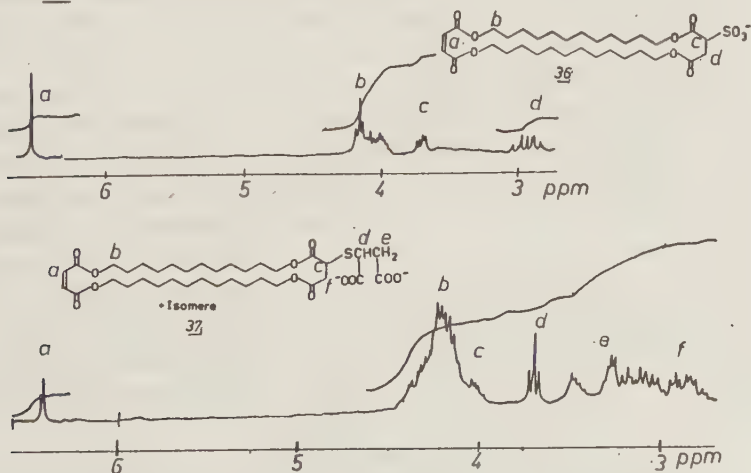


Abb.19: ^1H -NMR-Spektren für das Monosulfoaddukt 36 und das Monothiosuccinataddukt 37 (Teilspektren 4-7 ppm).

Der zweite Weg zu den unsymmetrischen monoschichtigen Amphiphilen 38 und 40 zu gelangen, führt über die schrittweise Addition von 2-Mercaptosuccinat bei pH 7,2 und die nachfolgende Umsetzung mit Natriumhydrogensulfit in Isopropanol/Wasser 4:1. Das unsymmetrische Bolaamphiphile 40 enthält im hydrophoben Gerüst C_{10} -Ketten. Das Monothiosuccinataddukt 37 (siehe Reaktionsskizze in Abb.18) kann in einer guten Ausbeute isoliert werden. Die Reinigung erfolgte über die Auswaschung der Nebenprodukte, dem Makrotetrolid 10 und dem Dithiosuccinataddukt 35.

Im IR-Spektrum findet man eine $-C=C-$ Valenzschwingung bei $\nu = 1630\text{ cm}^{-1}$, sowie die Schwingungsbanden für die COO^- -Gruppe (siehe Kapitel 7.5.2.2.). Während der Reaktion lagerte sich die freie Doppelbindung des Monothiosuccinatadduktes 37 von der Z-Form in die E-Form um. Im 1H -NMR-Spektrum (siehe Abb. 19) ist dies deutlich an der Verschiebung der Doppelbindungsprotonen von 6,3 auf 6,88 ppm zu erkennen. Die Elementaranalyse und die Schichtchromatographie an Kieselgel bestätigen die Reinheit der Substanz 37.

Im zweiten Schritt vollzog sich die Umsetzung des Monothiosuccinatadduktes 37 mit Natriumhydrogensulfit zur unsymmetrisch disubstituierten Verbindung 38 nach den üblichen Bedingungen (siehe dazu Kapitel 7.5.2.3.).

Das Verschwinden der $-C=C-$ Valenzschwingung, sowie das Auftauchen der Schwingungsbanden für die SO_3 -Gruppe im IR-Spektrum, und das Fehlen der Doppelbindungsprotonen bei $\delta = 6,88\text{ ppm}$ im 1H -NMR-Spektrum weisen auf eine erfolgte Addition des Natriumhydrogensulfits hin. Weiterhin stimmen die chemischen Verschiebungen und Intensitäten der Protonenresonanzsignale mit den erwarteten Daten überein. In der Abb.20 ist das NMR-Spektrum aufgeführt.

Die Verbindung 38 kann durch Titration mit verdünnter Salzsäure von der Salzform in die freien Carbonsäuren überführt werden (weitere Daten siehe 7.5.2.3.).

Die analoge Umsetzung des Makrotetrolids 12 (siehe Kapitel 2.1.) mit 2-Mercaptosuccinat und Natriumhydrogensulfit führt zu den Additionsverbindungen 39 und 40 (zur Charakterisierung

siehe Kapitel 7.5.2.4. und 7.5.2.5.)). Die unsymmetrische Verbindung 40 ist in der Salzform sehr gut wasserlöslich, kann aber durch Säurezusatz in ihrer Wasserlöslichkeit erniedrigt werden. Das ^1H -NMR-Spektrum der Verbindung 40 zeigt die Abb.20.

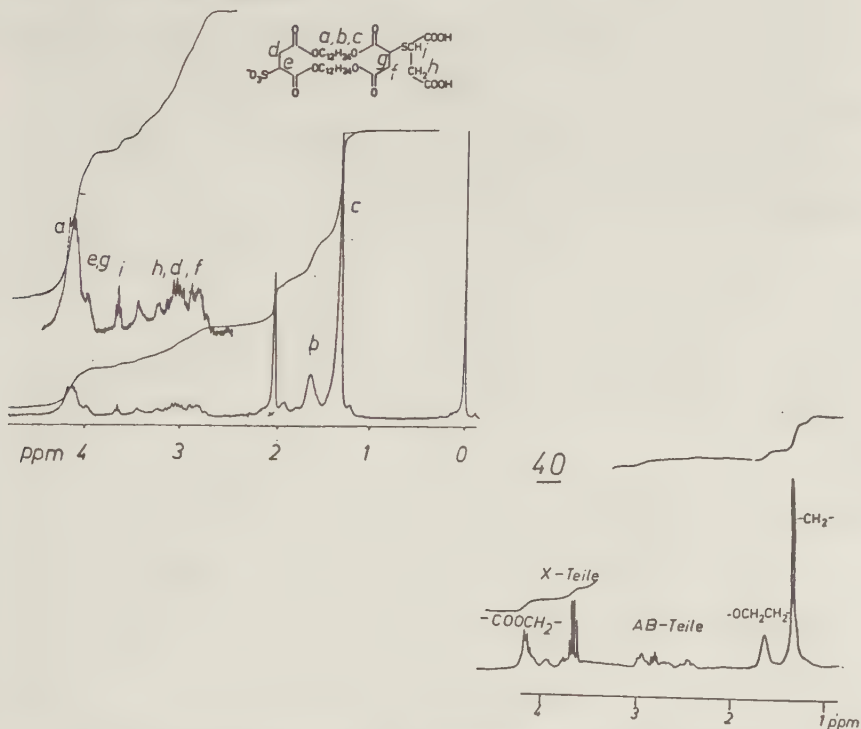
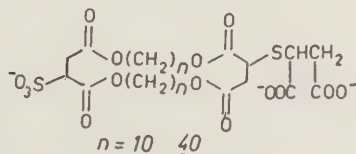
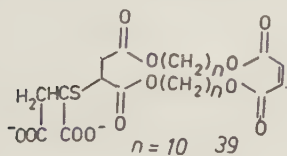


Abb.20: ^1H -NMR-Spektren der unsymmetrischen Bolaamphiphile 38 und 40 (270 MHz).



Zur Charakterisierung der unsymmetrischen monoschichtigen Verbindung 38 wurden verschiedene Methoden herangezogen. Die elektronenmikroskopischen Untersuchungen sind im Kapitel 6.1. aufgeführt. Einen indirekten Beweis für die Asymmetrie liefern Untersuchungen des metachromatischen Effektes von Acridinorange und Methylenblau in Kapitel 6.2. Einschlußexperimente mit der MLM-Vesikel aus 38 sind in den Kapiteln 6.3. und 6.4. enthalten. Eine temperaturabhängige ^1H -NMR-spektroskopische Untersuchung ist im Kapitel 6.5. beschrieben. Zur Stabilität der unsymmetrischen monoschichtigen Membran sind die Ergebnisse in Kapitel 6.6. zusammengefasst.

4.3. ^1H -NMR-Spektren der monosubstituierten Bernsteinsäure- derivate und Vergleichsspektren

Durch die Michael-Addition von schwefelhaltigen Nucleophilen an die in den Kapiteln 3. und 4. beschriebenen Maleinsäure- und Maleinsäuretetraester entstehen monosubstituierte Bernsteinsäurederivate ⁴⁸. Das CHCH_2 -Teil des NMR-Spektrums bildet ein ABX-System ⁵⁶ ($\text{CH}_2=\text{AB}$ -Teil; $\text{CH}=\text{X}$ -Teil). Aus den Spektren errechnet man die Absolutwerte der Kopplungskonstanten J_{AB} , J_{AX} und J_{BX} (in Hz), sowie die chemischen Verschiebungen δ_{A} , δ_{B} und δ_{X} (in ppm). Von den CH_2 -Protonen wurde das Proton mit dem niedrigsten δ -Wert als A-Proton bezeichnet. Aus Tabelle 1 geht hervor, daß die NMR-Daten der Säuren und ihrer Ester in demselben Lösungsmittel fast übereinstimmen. Es ist übrigens eine bekannte obwohl nicht allgemeingültige Regel, daß die Esterbildung einer Säure nur einen geringen Einfluß auf das NMR-Spektrum des Säuresubstituenten hat ⁵⁷.

In den Fällen, wo die Verbindungen der Tabelle 1 in mehr als einem Lösungsmittel untersucht worden sind, sind die Kopplungskonstanten J_{AB} , J_{AX} und J_{BX} einer Verbindung innerhalb etwa 1-2 Hz unabhängig von dem verwendeten Lösungsmittel. Die vicinalen Konstanten J_{AX} und J_{BX} sind konstitutionsabhängig. Dieser Sachverhalt ist in der Abb.21 dargestellt. Die geminalen Konstanten J_{AB} und die Summen $J_{\text{S}} = |J_{\text{AX}} + J_{\text{BX}}|$ von den vicinalen Konstanten sind sehr wenig abhängig von der Konstitution der Verbindung und dem Lösungsmittel. Solche Regelmäßigkeiten in dem Verhalten der Konstanten in den Verbindungen von den ABC-, ABX- und AB-Typen findet man auch in anderen Reihen dieser Verbindungen ⁵⁸.

In allen Bernsteinsäurederivaten der Tabelle 1 ist das Kohlenstoffatom der Methingruppe in CHCH_2 asymmetrisch. Dies bedeutet, daß die beiden geminalen Protonen in CHCH_2 sich in magnetisch verschiedenen Umgebungen befinden können und damit verschiedene δ_{A} und δ_{B} haben können. Die Analysen der Spektren zeigt, daß dies bei den untersuchten Bernsteinsäurederivaten zutrifft. Die Differenzen dieser Werte in Hz sind

in der letzten Kolonne der Tabelle 1 angegeben. Die δ -Werte sind von dem Lösungsmittel abhängig.

Tabelle 1: NMR-Daten des CHCH_2 -Teiles (δ in ppm; J und $\Delta\nu$ in Hz) von den Bernsteinsäureamphiphil und Bernsteinsäuremodellverbindungen

Verbindung	Lösungsmittel	δ_A	δ_B	δ_X	J_{AB}	J_{AX}	J_{BX}	$J_{AX}+J_{BX}$	$\Delta\nu$
41	D_2O	3,04	3,16	4,24	16	6	10	16	32,4
42	D_2O	2,84	3,00	3,80	16	6	10	16	43,2
44	D_2O	2,12	2,24	3,1	14	4	12	16	32,4
45	D_2O	2,86	2,98	2,78	16	4	8	12	32,4
29	CD_3COOD	2,77	2,89	3,63	16	4	11	15	32,4
30	CD_3COOD	2,80	2,98	3,9	16	4	12	16	48,6
34	CDCl_3	2,82	2,94	3,72	16	4	12	16	32,4
35	CD_3COOD	2,84	3,0	3,9	16	4	12	16	43,2
25	CD_3COOD	2,82	2,96	3,98	10	4	6	10	43,2
26	CD_3COOD	2,87	2,98	3,88	16	6	10	16	32,4
27	CDCl_3	2,8	2,94	3,86	16	6	8	14	37,8
36	DMSO	2,8	2,94	3,64	16	4	11	15	32,4
37	CD_3COOD	2,84	2,96	3,96	16	4	12	16	32,4
38	CF_3COOD	3,3	3,42	4,3	16	4	12	16	32,4
40	$\text{D}_2\text{O}/\text{CD}_3\text{OD}$	2,82	2,95	3,94	16	4	12	16	35,1

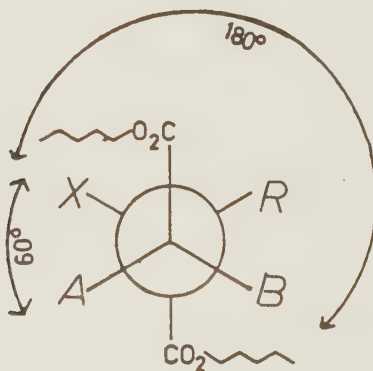
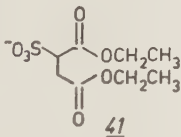
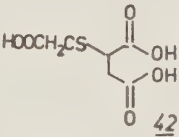
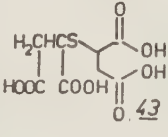
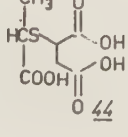


Abb.21: Die Abhängigkeit der Kopplungskonstanten der vicinalen Protonen vom Diederwinkel.

Zur besseren Charakterisierung der in den Kapiteln 3. und 4. beschriebenen Bernsteinsäureamphiphilen wurden Vergleichssubstanzen hergestellt, die eine weitere Absicherung in der Interpretation der Protonenresonanzspektren gestatten. In einigen Spektren der Bernsteinsäureamphiphile sind die Multipletts des ABX-Systems wegen der ungünstigen Relation zwischen Kopfgruppen- und Kettenprotonen schlecht aufgelöst. Der Vergleich mit den Modellsubstanzen der gleichen Köpfe an Maleinsäure bzw. Maleinsäurediethylester sichert die Zuordnung ab. Die Modellverbindungen 41 - 44 wurden durch Addition der schwefelhaltigen Nucleophile im wäßrigen Medium an Maleinsäure bzw. an Maleinsäurediethylester für die Verbindung 41 gewonnen. Die Modellverbindungen 41 - 44 sind in der Tabelle 2 aufgeführt.

Tabelle 2:	Verbindung	Struktur
	3-Sulfobernsteinsäurediethylester <u>41</u> <u>59</u>	 <u>41</u>
	Carboxomethylthiobernsteinsäure <u>42</u> <u>60</u>	 <u>42</u>
	3-Bernsteinsäure-(2-thiobernsteinsäure) <u>43</u> <u>61</u>	 <u>43</u>
	3-Bernsteinsäure-(2-thiomilchsäure) <u>44</u> <u>61</u>	 <u>44</u>

Nähere Informationen zu der Darstellung dieser Verbindungen und zu deren Charakterisierung siehe Kapitel 7.6.

In der Abb.22 sind die ^1H -NMR-Spektren des 3-Sulfobernsteinsäurediethylesters 41, der Carboxomethylthiobernsteinsäure 42 und der 3-Bernsteinsäure-(2-thiobernsteinsäure) 43 aufgeführt. Die Zuordnungen der Signale zu den entsprechenden Protonen und die Kopplungen sind in der Abbildung enthalten.

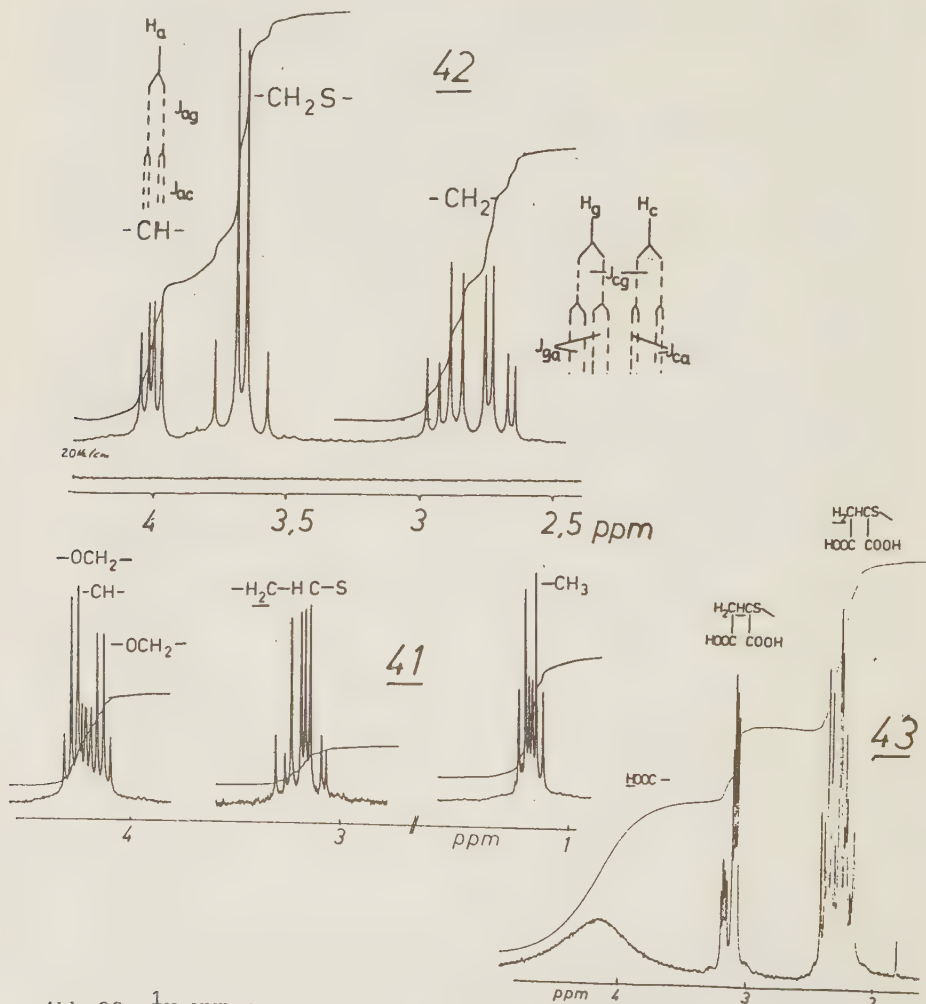


Abb.22: ^1H -NMR-Spektren der Modellverbindungen 41 - 43 in D_2O (270 MHz).

4.3.1. Detaillierte Interpretation des ^1H -NMR-Spektrums des Thioacetatamphiphilen 30

Am Beispiel des im Kapitel 4.1. beschriebenen Thioacetatamphiphilen 30 soll eine detaillierte Interpretation der NMR-Spektren der Bernsteinsäureamphiphilen erläutert werden.

Durch die Addition des Mercaptoacetats ist an beiden Köpfen je ein asymmetrisches Kohlenstoffzentrum entstanden. Durch die Nachbarschaft zu dem Asymmetriezentrum sind die Methylenprotonen c und g nicht mehr äquivalent; die Protonen a, c und g bilden ein typisches ABX-System.

G und c zeigen eine geminale Kopplung und eine Aufspaltung in zwei Dupletts bei $\delta = 2,8$ und $2,98$ ppm mit der Kopplungskonstanten J_{cg} von 16 Hz. Die chemische Verschiebung ist gering, sie beträgt $0,18$ ppm. Die vier cg-Linien spalten wegen der Kopplung mit dem Proton a in je ein Duplett auf (siehe Abb.23). Die Kopplungskonstanten J_{ca} und J_{ga} hängen stark von dem Diederwinkel zwischen den vicinalen Protonen c-a und g-a ab (siehe dazu Abb.21). Die Kopplungskonstante ist am größten und liegt zwischen 8 und 14 Hz, wenn die vicinalen Protonen im Winkel von 180° (trans-coplanar) oder im Winkel von 0° (cis-coplanar) zueinander stehen. Die Kopplungskonstante befindet sich im Bereich von 1-7 Hz, wenn der Winkel 60° beträgt. Mit Hilfe der Newman-Projektion können die Winkelverhältnisse anschaulich dargestellt werden (siehe Abb.21). Aufgrund einer Kopplungskonstanten von 12 Hz konnten die Dupletts bei $\delta = 2,96$ und $3,02$ ppm dem Proton g mit $J_{ga} = 12$ Hz und die Dupletts bei $\delta = 2,78$ und $2,84$ ppm dem Proton c mit $J_{ca} = 4$ Hz zugeordnet werden.

Das Proton a liefert durch Kopplung mit H_c und H_g ein Quadruplett mit Linien etwa gleicher Intensität. Das Signal erscheint bei $\delta = 3,89$ ppm. Die starke paramagnetische Verschiebung von $1,09$ ppm gegenüber den Protonen c und g zeigt eine unterschiedliche chemische Verschiebung an, verursacht durch den induktiven Effekt der $-\text{SCH}_2\text{COO}^-$ -Gruppe. Substituenten mit induktivem Effekt führen zu geringerer Abschirmung und somit zur Verschiebung nach tieferem Feld.

Der induktive Effekt der $-\text{SCH}_2\text{COO}^-$ -Gruppe wirkt sich auch auf die Methylenprotonen b aus. Das Triplet bei dem Makrotetrolid 10 (siehe Abb.6b) wird in dem symmetrischen Thioacetataddukt 30 zum Multipllett bei $\delta = 4,15$ ppm aufgespalten.

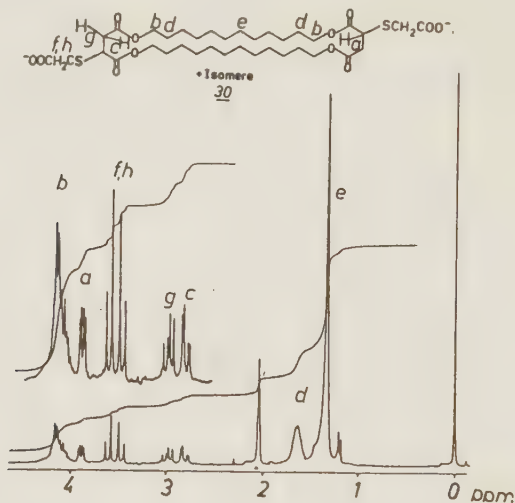


Abb.23: ^1H -NMR-Spektrum des Thioacetatadduktes 30 in CD_3COOD (270 MHz).

Die Methylenprotonen d erscheinen als breites, schlecht aufgelöstes Signal bei $\delta = 1,64$ ppm und die restlichen Methylenprotonen e ergeben ein Singulett bei $\delta = 1,36$ ppm. Ein Vergleich des ABX-Systems des Thioacetatadduktes 30 mit dem ABX-System der Carboxomethylthiobernsteinsäure 42 (siehe Abb.22), die in D_2O gelöst war, zeigt, daß die δ -Werte vom Lösungsmittel abhängig sind. Die chemischen Verschiebungen weichen etwas von den Werten der Verbindung 30 in CD_3COOD ab. Die Protonen f und h bilden ein AB-System und tauchen im Spektrum des Thioacetatadduktes 30 als Quadruplett bei $\delta = 3,53$ ppm auf mit $J_{fh} = 16$ Hz und $\Delta\nu = 0,16$ ppm.

4.4. Intramolekulare asymmetrische Induktion durch die Sulphinylgruppe ⁶²

Sulfoxide haben eine pyramidale Struktur bei der das Schwefelatom den Scheitelpunkt besetzt. Die Struktur kann als formales Tetraeder angesehen werden, wenn das einsame Elektronenpaar als vierter Substituent gezählt wird. Sobald R' und R'' verschieden sind, wird das Schwefelatom ein chirales Zentrum (siehe Abb.24).

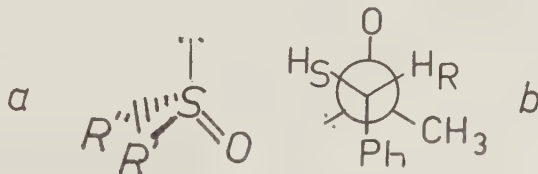


Abb.24: a) Das Schwefelatom als chirales Zentrum in Sulfoxiden.
b) Newman-Projektion des Benzylmethylsulfoxides;

Die thermische Stereomutation der Sulfoxide findet erst bei Temperaturen um 200°C in höheren Raten statt.

Die hohe Stereoselektivität der Reaktionen, die chirale und prochirale Gruppen α -ständig zu der Sulphinylgruppe einschließen, findet sich besonders bei pyrolytischen Eliminierungen zu den Olefinen, und elektrophilen Substitutionen am α -C-Atom (H-D-Austausch, Metallierung und Halogenierung) wieder.

Die erste Arbeit über die Stereochemie von α -Sulphinyl-Carbanionen stammt von Cram ⁶³. In einer Untersuchung der relativen Austauschraten H-D (k_e) und der Racemisierung (k_a) an der 2-Position des diastereomeren Phenyl-2-octylsulfoxides fand er ein Verhältnis von k_e/k_a von 3,6 - 0,6. Die Sulphinylgruppe scheint eine geringe Tendenz zu besitzen die Asymmetrie eines α -Carbanions zu halten. Wolfe ⁶⁴ fand dagegen, daß in NaOD/D₂O die diastereotopen Methylenprotonen (H_R , H_S) des Benzylmethylsulfoxids einem H-D-Austausch in ungewöhnlichen Raten von bis zu 14:1 ($H_R:H_S$) unterliegen (siehe Abb.24b). Die Carboxomethylsulfinbernsteinsäure 45, die durch Ozonoxidation der Carboxomethylthiobernsteinsäure 42 (siehe 4.3)

erhalten wurde, zeigt im ^1H -NMR-Spektrum in D_2O eine Wechselwirkung des Substituenten mit den diastereotopen Methylenprotonen an. Gleichzeitig findet an der $-\text{CH}-$ Gruppe des Bernsteinsäuregerüsts ein H-D-Austausch von 50% statt. Damit wären Vorarbeiten für die Übertragung der Reaktion auf das Thioacetataddukt 30 gemacht. Eine Oxidation der Sulfidgruppe zum Sulfoxid könnte eine Reaktion eröffnen, die zur Trennung der Isomeren führen könnte.

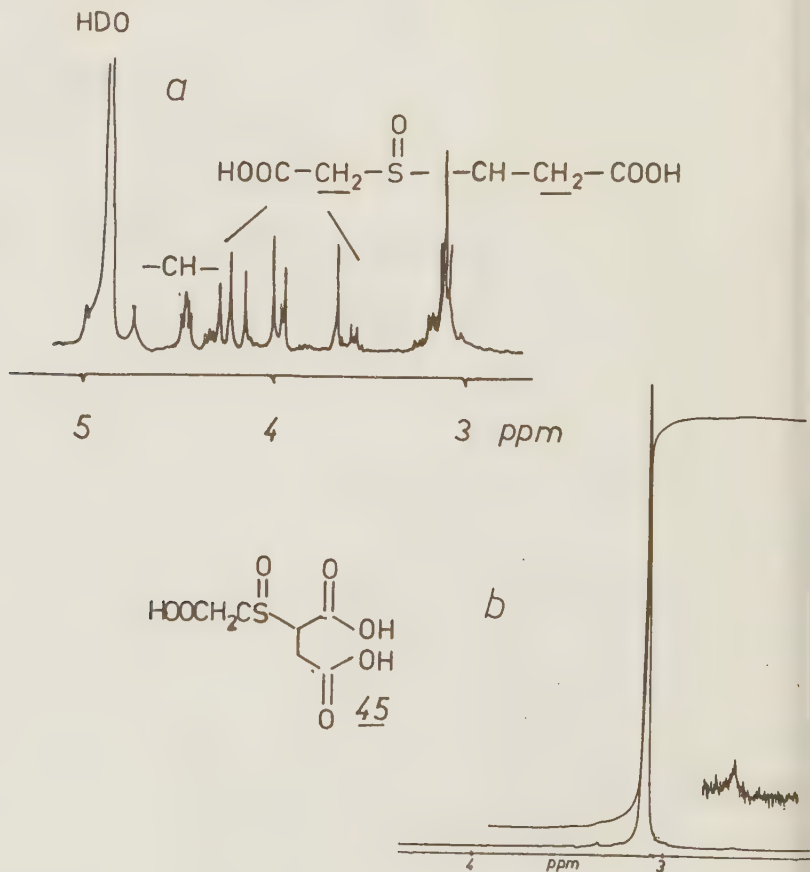


Abb.25: a) ^1H -NMR-Spektrum der Carboxomethylsulfinic Säure 45 in D_2O (270 MHz).

b) Das NMR-Spektrum der Verbindung 45 nach der Zugabe von NaOD (270 MHz).

4.5. Chirale Erkennung an Bernsteinsäurederivaten

Das Proton am α -ständigen C-Atom der Sulfobernsteinsäureverbindungen 24, 29 und 41 besitzt sauren Charakter. Diese CH-Acidität wird durch die induktiven Effekte der $-\text{SO}_3$ -Gruppe und der $-\text{COOR}$ -Gruppe hervorgerufen. Im basischen Milieu sollte es möglich sein das Proton zu abstrahieren. Dadurch ginge die Chiralität des Kohlenstoffatoms verloren. Beim Ansäuern könnte sie wieder gewonnen werden. Wenn man diese Deprotonierungs-Protonierungscyclen in chiralen Gastvesikeln (z.B. Weinsäurediester) durchführt, könnte durch die vorgegebene Konfiguration der Gastvesikel eine enantioselektive Umlagerung induziert werden. Das ^1H -NMR-Spektrum des Sulfobernsteinsäurediethylesters 41 in $\text{D}_2\text{O}/\text{NaOD}$ zeigt zwar, daß das Signal für das Proton bei $\delta = 4,3$ ppm verschwindet, aber es tritt auch eine Hydrolyse des Diesters 41 ein. Vorversuche an den Sulfobernsteinsäureamphiphilen 24 und 29 führten ebenfalls zu einer Hydrolyse der Esterbindungen. Die Amphiphilen 24 und 29 wurden dazu in Methanol in der Hitze gelöst und mit Natrium versetzt. Eine dünnschichtchromatographische Untersuchung belegte die Bildung von Hexadecanol und Dodecandiol.

Als letzter Versuch die Problemstellung zu lösen, wurden Untersuchungen an Vesikellösungen des Sulfoadduktes 29 vorgenommen. Die Ergebnisse sind in dem Kapitel 6.5. zusammengestellt.

Als zweites System wurde die Carboxomethylthiobernsteinsäure 42 und das Thioacetataddukt 30 dieser NMR-Untersuchung unterzogen. Bei der Carboxomethylthiobernsteinsäure 42 kam es in D_2O zu keinem H-D-Austausch an der CH-Gruppe des Bernsteinsäuregerüsts im ^1H -NMR-Spektrum. Im System $\text{NaOD}/\text{D}_2\text{O}$ war kein Austausch zu sehen. Die Ergebnisse der NMR-Untersuchungen an Vesikellösungen, die aus dem Thioacetataddukt 30 hergestellt wurden, sind in dem Kapitel 6.5. beschrieben.

5. Phosphorsäureester als membranbildende Amphiphile

Die natürlichen Membranbildner sind in der Regel Phospholipide. Sie treten sowohl bei Bakterien, Tieren, Pflanzen als auch beim Menschen auf. Die natürlichen Phospholipide bilden in wäßrigem Medium Doppelschichtmembranen aus. Ebenso ergeben synthetische langkettige Phosphorsäurediester nach Ultrabeschallung in Wasser doppelschichtige Vesikeln. Bisher wurden von verschiedenen Autoren vor allem Phosphorsäuredidodecylester und -dihexadecylester untersucht 65-67. Im Rahmen dieser Arbeit wurden die beiden Dialkylester, Phosphorsäuredihexadecylester 46 und Phosphorsäuredioctadecylester 47, synthetisiert und an den Vesikellösungen aus 46 und 47 verschiedene Untersuchungen durchgeführt.

Neben diesen Experimenten mit den langkettigen Dialkylestern, sollte die Synthese eines makrocyclischen Phosphorsäuretetrolids 48 versucht werden. Bei Beschallung des Tetrolides 48 in Wasser sollten sich monoschichtige Vesikeln bilden.

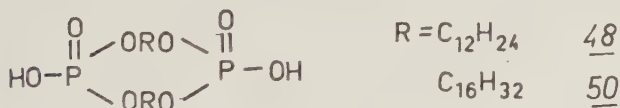
In der Literatur sind zahlreiche Methoden zur Darstellung von Phosphorsäurediestern beschrieben 68-70. Während die Veresterung von Phosphoroxychlorid, Phosphorpentaoxid und der Phosphorsäure bei den kurzkettigen Alkoholen nicht selektiv verläuft, es bilden sich meist Gemische aus Mono-, Di- und bisweilen auch Triestern, sowie Monoesterdihalogenide und Diesterhalogenide als Nebenprodukte, ist die Phosphorylierung langkettiger Alkohole mit Phosphoroxychlorid ein einfaches und preiswertes Verfahren, um vor allem Diester der Fettalkohole herzustellen. Nebenprodukte, wie Alkylchloride, können durch Umkristallisieren entfernt werden.



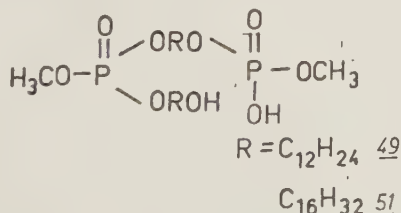
Nach Kunitake et al. ⁷¹ ergibt die Veresterung von Phosphoroxychlorid mit drei Molen Fettalkohol in einer Einstufensynthese den Phosphorsäuredihexadecylester 46 in guter Ausbeute. Eine Überprüfung dieser Vorschrift bestätigte die Resultate. Analog zu einer Vorschrift nach Cremlyn und Dewhurst ⁷² kann die Veresterung in Gegenwart einer tertiären Base, wie Pyridin oder Triethylamin, als Säurefänger auch bei tiefen Temperaturen ausgeführt werden; man vermeidet die Bildung von Alkylchloriden.

Über die Umsetzung von α, ω -Diolen mit Phosphoroxychlorid sind in der Literatur Hinweise auf die Veresterung kurzkettiger Diöle angeführt, die zur Ausbildung kleiner Ringe führen ^{73,74}. Über die Bildung von Phosphorsäuremakrotetroliden ist meines Wissens nichts bekannt.

Die Veresterung von POCl_3 mit 1,12-Dodecandiol bzw. 1,16-Hexadecandiol in großem Überschuß an Benzol führte zu dem Bis-phosphorsäure-didodecandiyl-tetrol 48 und dem Bis-phosphorsäure-dihexadecandiyl-tetrol 50 in Ausbeuten zwischen 2-10%. Als Nebenprodukte fallen polymere Phosphorsäureester und 1,12-Dichlordodecan bzw. 1,16-Dichlorhexadecan an.



Die Veresterung der Tetrolide 48 und 50 mit etherischer Diazomethanlösung in Methanol/Wasser führte zu den Dimethylestern 49 und 51.



5.1. Spektroskopische Charakterisierung von Phosphorsäureestern

5.1.1. IR-Spektroskopie

Die IR-spektroskopische Analyse ⁷⁵ von Phosphorsäureestern zeigt folgende charakteristische Frequenzen. Die P=O-Valenzschwingung bei $\nu = 1230 \text{ cm}^{-1}$ und die P-O-C-Valenzschwingung bei $\nu = 1040 \text{ cm}^{-1}$ treten als Hauptfrequenzen auf. Die Phosphorsäureester zeigen starke Wasserstoffbrückenbindungen im festen Zustand. Die POOH-Gruppe ergibt mehrere Banden bei $\nu = 2725\text{-}2525 \text{ cm}^{-1}$, $2350\text{-}2080 \text{ cm}^{-1}$, $1740\text{-}1600 \text{ cm}^{-1}$ und $1335\text{-}1087 \text{ cm}^{-1}$. Die P-O-C-Valenzschwingung ist in höheren Estern breit und komplex mit einem Maximum größer $\nu = 1025 \text{ cm}^{-1}$. Wenn Hydroxylgruppen in den Estern vorhanden sind, ist die P=O-Frequenz signifikant durch Wasserstoffbrückenbindungen erniedrigt und die Bande erscheint breit. Diester zeigen Dimerstruktur analog zu den freien Carbonsäuren. Die Brückenbindungen sind stärker ausgeprägt als bei den Carbonsäuren. In den Dialkylestern 46 und 47 tritt die P=O-Valenzschwingung bei $\nu = 1220 \text{ cm}^{-1}$ und die P-O-C-Valenzschwingung bei 1068 cm^{-1} auf. Bei dem Bis-phosphorsäure-didodecandiyl-tetron 48 traten die erwarteten Banden für die -POOH-Gruppe, die P=O-Valenzschwingung und die P-O-C-Valenzschwingung auf (siehe Kapitel 7.7.2.1.). Bei dem Bis-phosphorsäure-dihexadecandiyl-tetron 50 sind die Banden entsprechend der längeren Kette etwas verschoben.

5.1.2. ¹H-NMR-Spektroskopie von Phosphorsäureestern

In den offenkettigen Alkylestern der Phosphorsäure findet man im NMR-Spektrum, die in Abb.26 wiedergegebenen Aufspaltungsmuster der α -Alkylgruppen. Im Vergleich zu den entsprechenden Carbonsäureestern spalten die Alkylgruppen durch die Kopplung mit ³¹P n+1-mal auf ⁷⁶. Nach Masamichi et al. ⁷⁷ wird auch die β -Position vom Phosphor beeinflusst und es entsteht ein Multiplett. In fünf- und sechsgliedrigen Phosphorsäurecyclen werden unterschiedliche chemische Verschiebungen der geminalen Protonen der -POOCH₂-Gruppe gefunden ⁷⁸. Das ¹H-NMR-Spektrum zeigt große Doppelquartetts bei $\delta = 4,1 \text{ ppm}$ und ein Triplett bei $\delta = 3,5 \text{ ppm}$. Die Methylesterprotonen der -POOCH₃-Gruppe ergeben ein Duplett bei $\delta = 3,7 \text{ ppm}$ mit einer Kopplungskon-

konstanten $J_{HP} = 11 \text{ Hz}$.

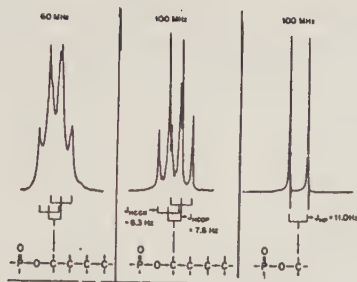


Abb.26: NMR-Teilspektren von α -Alkylgruppen in Phosphorsäureestern.

Von dem vermuteten Phosphorsäuretetrolid 48 ließ sich kein ^1H -NMR-Spektrum anfertigen, da die Verbindung in den gängigen Lösungsmitteln nicht löslich war. Zur Struktursicherung wurde das vermutete Tetrolid 48 mit etherischer Diazomethanlösung in Methanol/Wasser zum Dimethylester 49 umgesetzt. In Methanol aber erleiden cyclische Phosphorsäureester eine Ringöffnung und es tritt Stereomutation am Phosphor ein ⁷⁹. Die Stereomutation am Phosphor ergibt ein Gemisch von 2 Isomeren, eins mit den Methoxylprotonen oben und eins mit den Methoxylprotonen unten. Unter Berücksichtigung all dieser Sachverhalte ließ sich das ^1H -NMR-Spektrum des Dimethylesters 49 eindeutig interpretieren. In der Abb. 27 sind die ^1H -NMR-Spektren von frischen und gealterten methanolischen Lösungen des Dimethylesters 49 abgebildet. Das Tetrolid 48 wurde also bei der Derivatisierung an einer Esterbindung gespalten; dies ergab sich aus den Intensitätsverhältnissen der $-\text{POOCH}_2$ -Gruppen und der $-\text{CH}_2\text{OH}$ -Gruppe, die sich wie 3:1 verhalten. In den gealterten Lösungen des Dimethylesters 49 zeigte sich die stattgefundene Stereomutation in der Verdoppelung der Signale für die $-\text{POOCH}_2$ -Gruppen und für die $-\text{POOCH}_3$ -Gruppen. Man kann also aus diesen Ergebnissen zurückschließen, daß der Makrocyclus der Verbindung 48 vor der Veresterung mit etherischer Diazomethanlösung intakt war. Eine Bestätigung ergab sich aus dem ^1H -NMR-Spektrum des Bis-phosphorsäure-dihexadecandiyli-tetrons 50. Das Tetrolid 50 löste sich in CDCl_3 und ergab die erwarteten chemischen

Verschiebungen und Intensitäten für das Tetrolid 50. Das NMR-Spektrum des Tetrolids 50 ist in der Abb.28 dargestellt.

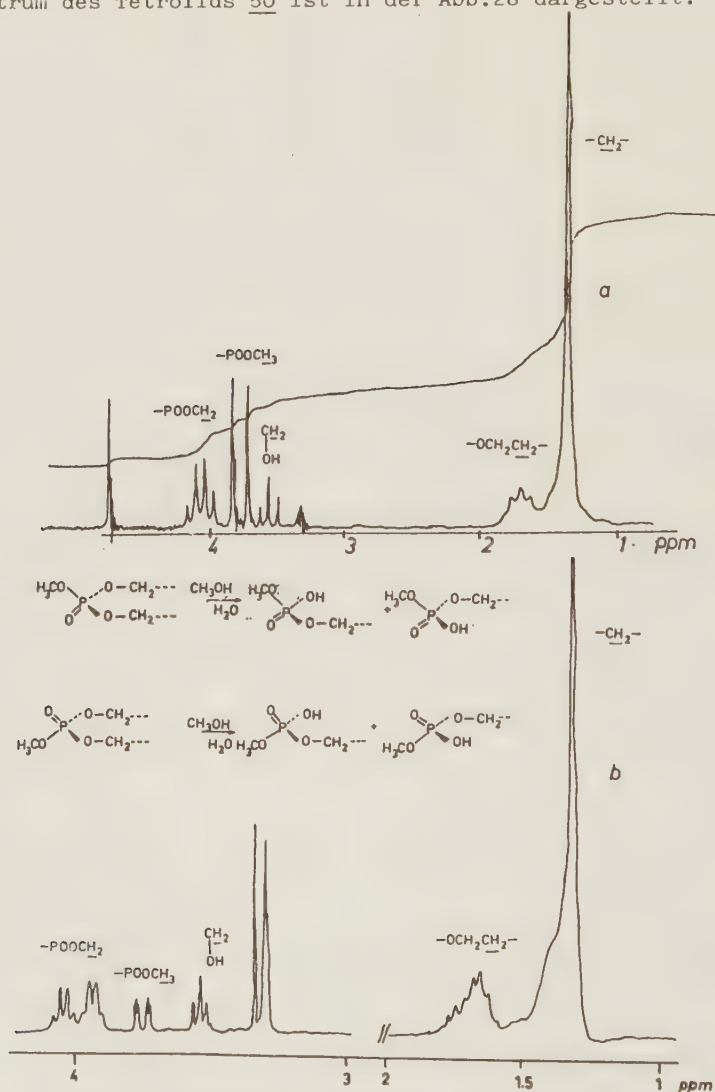


Abb.27a: ^1H -NMR-Spektrum des Dimethylesters 49 in CD_3OD (100 MHz) (frische Lösung);

27b: NMR-Spektrum einer gealterten Lösung des Dimethylesters 49 in CD_3OD (270 MHz).

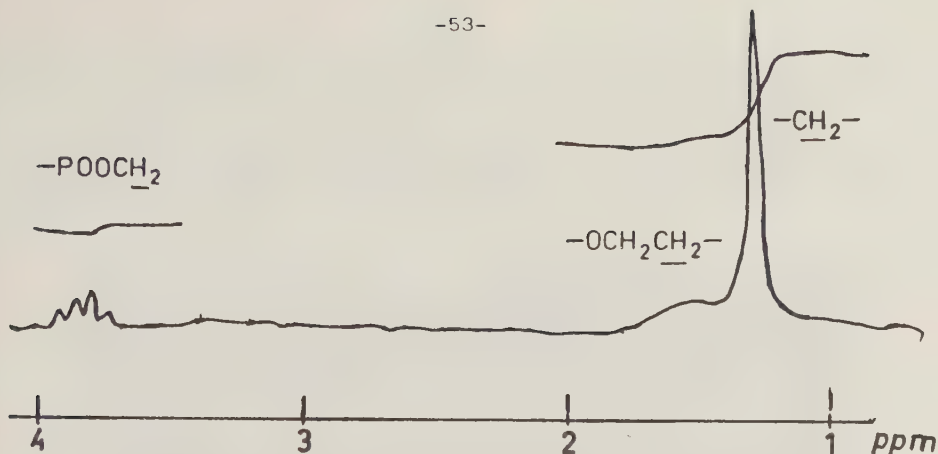


Abb.28: ^1H -NMR-Spektrum des Bis-phosphorsäure-dihexadecandiyl-tetrons 50 in CDCl_3 (100 MHz).

5.1.3. Massenspektren der Phosphorsäuretetrolide 48 und 50 und der Dimethylester 49 und 51

Das Massenspektrum des Bis-phosphorsäure-didodecandiyl-tetrons 48 liefert den Molpik bei m/e : 528. Die Massenspektren der Dimethylester 49 und 51 tragen der Hydrolyse in Methanol Rechnung und zeigen neben den Molpiks für die Dimethylester 49 (m/e :556) und 51 (m/e :668) noch $(\text{M}+\text{H}_2\text{O})^+$ -Piks bei m/e :574 und m/e :684.

Aus allen diesen Daten und den Elementaranalysen ergab sich, daß die Synthese des Phosphorsäuremakrotetrolide 48 und 50 gelungen war. Die Produkte sind dünnschichtchromatographisch einheitlich und ergaben befriedigende Elementaranalysen.

5.2. Charakterisierung der Phosphorsäureamphiphile

Die im Kapitel 5.1. beschriebenen Phosphorsäureamphiphile wurden mit Elektronenmikroskopie, Einschlußexperimenten und durch ihre Wechselwirkung mit Farbstoffen charakterisiert.

5.2.1. Elektronenmikroskopie

Die Methode der Vesikelpräparation und die Präparationstechnik für die Elektronenmikroskopie sind in dem Kapitel 6.1. beschrieben. Die Vesikeldispersionen wurden im allgemeinen bei $\text{pH} = 8-9$ beschallt. Für die Phosphorsäureamphiphile 46, 47, 48 und 50 ergaben sich nach 30-minütigem Beschallen klare bis leicht opaleszierende Vesikellösungen.

Die elektronenmikroskopischen Aufnahmen von Vesikellösungen des Phosphorsäuredihexadecylesters 46 zeigten sphärische Vesikeln von etwa 500-1000 Å Durchmesser. In der Abb.29 sind diese Vesikeln wiedergegeben.

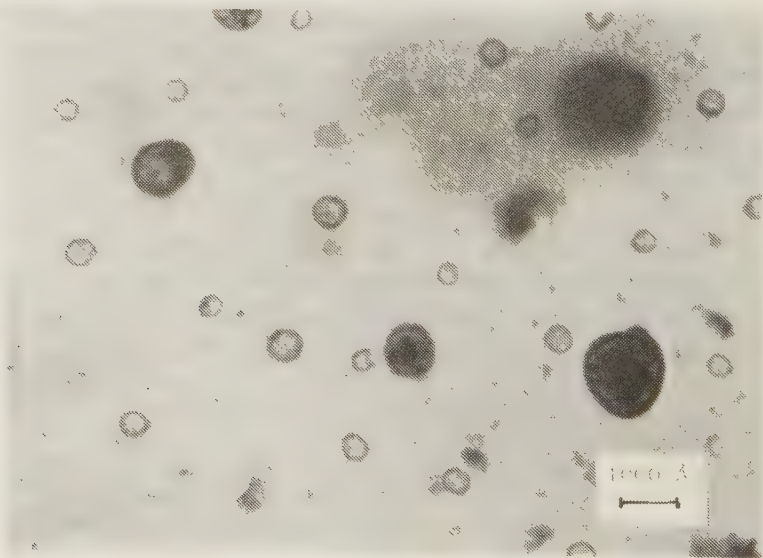


Abb.29: Elektronenmikroskopische Aufnahme von Vesikeln aus dem Phosphorsäuredihexadecylester 46 bei $\text{pH} 8$.

Beschallte Lösungen des Phosphorsäuredioctadecylesters 47 waren leicht opaleszent. Die elektronenmikroskopischen Aufnahmen zeigten keine normalen Vesikelstrukturen. Wie aus der Abb.30 zu ersehen ist, bildeten sich dicht gepackte sphärische Strukturen aus, die 1000-1500 Å Durchmesser haben.

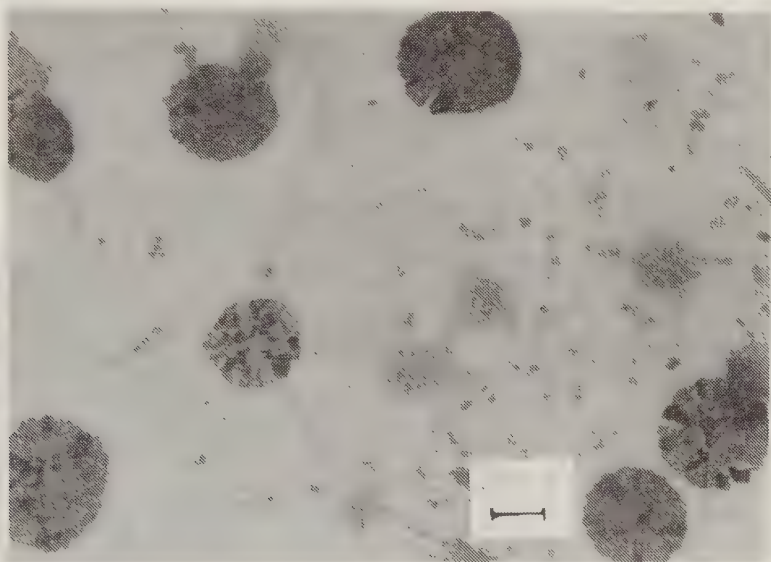


Abb.30: Elektronenmikroskopische Aufnahme einer beschallten Lösung des Phosphorsäuredioctadecylesters 47.

Eine Erklärung dafür, daß der Phosphorsäuredioctadecylester 47 keine normalen Vesikelstrukturen ausbildet, kann in einem ungünstigen Verhältnis hydrophil/hydrophob liegen. Die Ketten sind zu lang und dadurch könnten sich dicht gepackte Micellen bilden, die sich zu kugelförmigen Aggregaten zusammenlagern.

Der Übergang von den offenkettigen Phosphorsäureestern 46 und 47 zu den makrocyclischen Phosphorsäuretetroliden 48 und 50 veränderte die Aggregatstruktur drastisch. Beschallte Lösungen der Phosphorsäuremakrotetrolide 48 und 50 ergaben im elektronen-

mikroskopischen Bild Mikrovesikeln mit etwa 200 Å Durchmesser. In der Abb.31 sind diese Mikrovesikeln am Beispiel des Phosphorsäuretetrolids 50 dargestellt. Obwohl die Bolaamphiphile symmetrisch gebaut sind, bilden sich trotzdem Vesikeln aus. Dies könnte dadurch erklärt werden, daß die inneren und äußeren Kopfgruppen sich z.B. in ihrer Hydratation unterscheiden. Die innere Oberfläche könnte durch die dichte Packung weniger hydratisierter Kopfgruppen gebildet werden. Die äußeren Kopfgruppen haben mehr Platz zur Verfügung und eine größere Hydrathülle könnte die Lücken schließen. Die beschallten Lösungen der Phosphorsäuretetrolide 48 und 50 sind nur einige Tage stabil. Danach flokken sie aus der Lösung aus. Die Vesikellösungen können durch Zusätze stabilisiert werden.

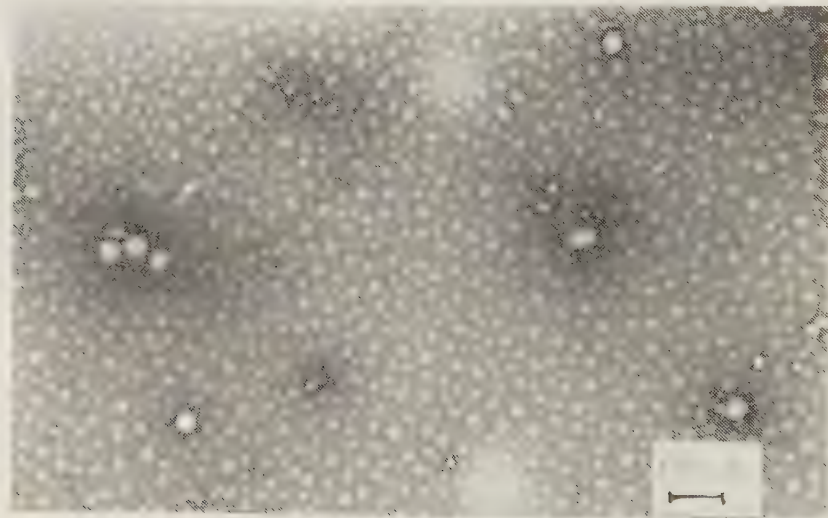


Abb.31: Elektronenmikroskopische Aufnahme von Vesikeln des Bis-phosphorsäure-dihexadecandiy-l-tetrons 50 bei pH 8.

Als Zusätze eigneten sich Phenolphthalein und Kaliumhexacyanoferrat $K_3Fe(CN)_6$. Vesikeln aus dem Phosphorsäuretetrolid 48 und etwa 10% Phenolphthalein sind wochenlang stabil. Beschallt man eine $10^{-3}M$ Vesikellösung des Bis-didodecandiy-l-tetrons 48 zusammen mit einer $2 \times 10^{-3}M$ Kaliumhexacyanoferratlösung und

dialysiert anschließend 48 Stunden gegen Wasser so entsteht eine leicht trübe, gelblich-grüne Lösung, die durch nochmaliges Beschallen klar wird und monatelang stabil bleibt. In der Abb. 32 sind die gebildeten Mikrovesikeln von 200-500Å zu erkennen. Das Kaliumhexacyanoferrat wurde sowohl an der inneren als auch äußeren Vesikeloberfläche komplex gebunden. Die gebildete Prussoverbindung stabilisiert die Vesikeln.

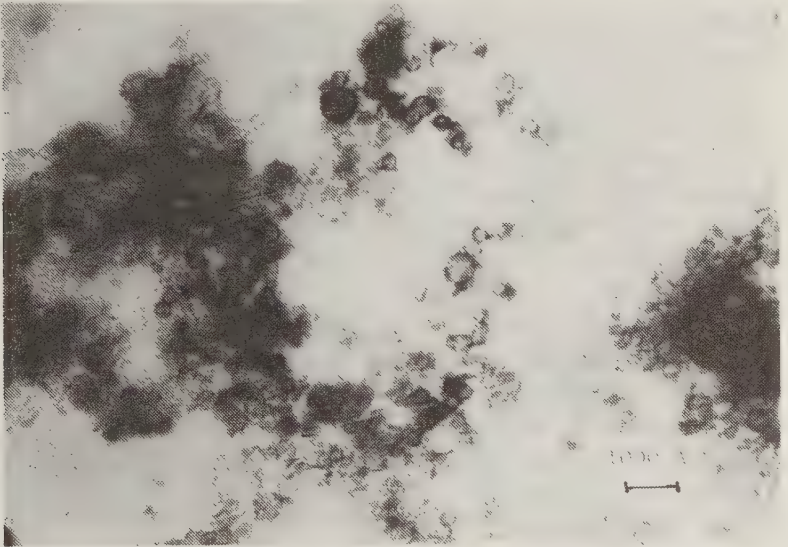


Abb.32: Elektronenmikroskopische Aufnahme der mit Kaliumhexacyanoferrat komplexierten Vesikeln des Phosphorsäure-tetrolids 48, nach der Dialyse.

Aus der Abbildung 32 ist zu erkennen, daß die komplexierten Vesikeln aus 48 stark aggregieren. Die beiden Zusätze zeigen, daß Vesikeln aus dem Bis-phosphorsäure-didodecandiyl-tetron 48, sowohl durch Einlagerung in die hydrophobe Membran als auch durch Komplexierung der Kopfgruppen, stabilisiert werden können.

5.2.2. Oberflächenspannungsmessungen an den Phosphorsäuremakrotetroliden

Die Oberflächenspannung von reinem Wasser beträgt 72 dyn/cm bei 18°C. Diese Oberflächenspannung wurde bei einer 10^{-3} M Vesikellösung des Bis-phosphorsäure-didodecandiyltetrons 18 bei 20°C auf 40 dyn/cm erniedrigt. Eine Vesikellösung des Tetrolids 50 lieferte einen Wert von 39 dyn/cm. Eine Temperaturerhöhung auf 50°C führte nur zu einer minimalen Absenkung der Oberflächenspannung auf 31 dyn/cm für die Verbindung 50 bzw. auf 35 dyn/cm für die Verbindung 48. Vesikelbildner, wie das Phosphorsäuretetrolid 48, führten also zu einer ähnlichen Erniedrigung der Oberflächenspannung des Wassers wie Mizellenbildner ähnlicher Struktur ⁸⁰. Bei Temperaturerhöhung ist das Absenken der Oberflächenspannung bei den Mizellenbildnern aber viel drastischer, z.B 19 dyn/cm für Laurylsulfat bei 50°C.

5.2.3. Einschlußversuche und Wechselwirkung mit Farbstoffen

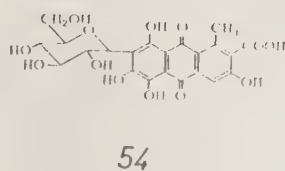
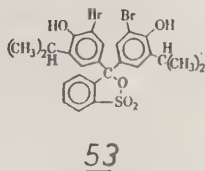
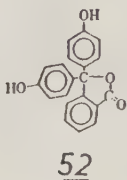
Der Einschluß von Magnesium-octaethylporphin in Vesikeln des Phosphorsäuredihexadecylesters 46 bzw. des Phosphorsäuretetrolids 48 sind im Kapitel 6.3 enthalten. Die Ergebnisse der metachromatischen Untersuchungen an Phosphorsäurevesikeln aus 46 und 48 sind im Kapitel 6.2. beschrieben.

Aus allen diesen Untersuchungen kann gefolgert werden, daß Phosphorsäuremakrotetrolide, wie 48 und 50, nach Beschallung in Wasser Mikrovesikeln ausbilden.

5.3. Membranbildung mit "Nicht-Amphiphilen"

Chang untersucht seit vielen Jahren "künstliche Zellen" mit Membranen aus beliebigen wasserunlöslichen Polymeren ⁸¹. Zu ihrer Herstellung schüttelt man die Lösung eines Polymers (Nylon, Polystyrol, Cellulosenitrat) in organischen Lösungsmitteln zusammen mit einer relativ konzentrierten wäßrigen Hämoglobinlösung. In der Wasserphase befinden sich dann wohldefinierte kugelförmige Membranen mit Schichtdicken von etwa 20 nm und Durchmessern bis etwa 0,1 mm. Analog aufgebaut sind die "Mikrosphären von Fox" ⁸². Sie bestehen aus "Proteinoiden" und sehen unter dem Mikroskop ähnlich aus wie die "künstlichen Zellen". Ein "Proteinoid" ist ein statistisch zusammengesetztes Polyamid, das entsteht, wenn Aminosäuregemische in wäßriger Phosphorsäure auf 100°C erhitzt werden. Beim langsamen Abkühlen fallen diese "Proteinoiden" nicht aus, sondern bilden spontan Mikrosphären von etwa 0,1 mm Durchmesser.

Eigene Beobachtungen zeigten, daß auch niedermolekulare, in Wasser schwerlösliche Nichtamphiphile bei Ultrabeschallung in Lösung gehen können und bei der Betrachtung mit dem Elektronenmikroskop als kugelförmige Membranen erscheinen. Beispiele dafür sind Phenolphthalein ⁵², Bromthymolblau ⁵³ und Carminsäure ⁵⁴.



Während die Carminsäure ⁵⁴, wie aus der Abbildung 33 zu ersehen ist, relativ kleine sphärische Gebilde ergab, wenn man eine $10^{-3}M$ wäßrige Lösung beschallte, zeigten sich in den elektronenmikroskopischen Aufnahmen von beschallten Lösungen des

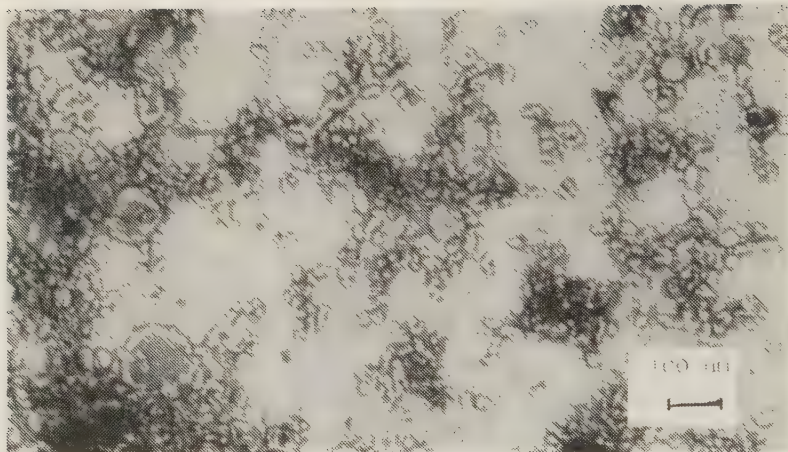


Abb.33: Elektronenmikroskopische Aufnahme von Membranen, die aus beschallten Carminsäurelösungen 54 gebildet werden.

Phenolphthaleins 52 und des Bromthymolblaus 53 relativ große Aggregate. In Abb.34 und 35 sind die elektronenmikroskopischen Bilder von beschallten Phenolphthalein- 52 und Bromthymol-
lösungen 53 dargestellt.

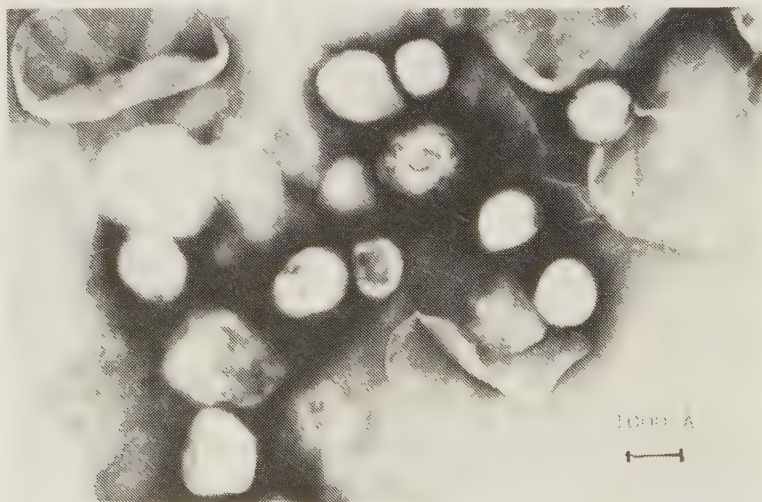


Abb.34: Elektronenmikroskopische Aufnahme von beschallten Lösungen des Phenolphthaleins 52

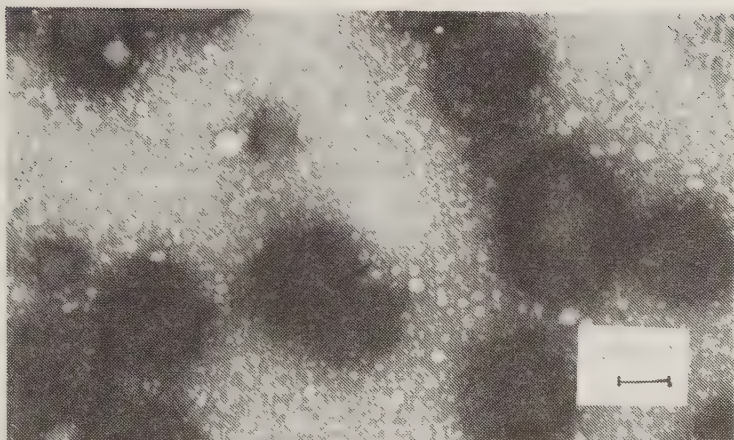


Abb.35: Elektronenmikroskopische Aufnahme einer beschallten Lösung von Bromthymolblau 53

Carminsäure, $C_{22}H_{20}O_{13}$ wurde von Pelletier und Caventon 83 1818 aus der Cochenille isoliert. O.Dimroth 84 stellte 1920 eine vorläufige Strukturformel auf, die Seitenkette am C_2 bestimmten Ali u.a. 85 und die endgültige Konstitution klärten Overeem et al. 86 auf.

Wegen der geringen Löslichkeit in Wasser, ihres Vorkommens in Fettkörpern und aufgrund des molekularen Aufbaus könnte Carminsäure 54 als monoschichtige membranbildende Verbindung geeignet zu sein. Der Zuckerkopf auf der einen Seite und die Carbonsäure auf der anderen Seite bilden die hydrophilen Kopfgruppen einer unsymmetrischen MLM. Das Anthrachinongerüst bildet den hydrophoben Teil der Membran, wobei keine flüssigkristallinen Strukturen möglich sind. Der bewegliche Teil aller bisher beschriebenen Membranbildner fehlt völlig.

Phenolphthalein 52 und Bromthymolblau 53 sind pH-Indikatoren. Wie aus der Abb.36 hervorgeht, liegen abhängig von dem pH-Wert der Lösung folgende Formen der Indikatoren vor. Beim Phenolphthalein 52 liegt bei pH-Werten kleiner 8,2 hauptsächlich die farblose Lactonform vor, während bei pH-Werten größer 10 hauptsächlich die rote Carboxylatform vorherrscht.

Bromthymolblau 53 liegt entsprechend dem pH-Wert der Lösung

in drei verschiedenen Formen vor. Bei pH kleiner 1 herrscht die Sulfonsäureform vor. bei pH 2-6 der cyclische Sulfonsäureester und bei pH größer 7,6 die Sulfonatform. Auch bei diesen Verbindungen findet man keine beweglichen oder flüssigen Anteile. Die Beschallungen mit Carminsäure 54, Phenolphthalein 52 und Bromthymolblau 53 wurden in Wasser bei pH 5 für 54, bei pH 8 für 52 und bei pH 7 für 53 vorgenommen. Bei diesen pH-Werten liegen Phenolphthalein 52 und Bromthymolblau 53 sowohl in der cyclischen als auch in der offenkettigen Form vor. Die Membranbildung für die Verbindungen 52 und 53 könnte durch die offenkettige Form induziert werden und in diese vorgeformte Membran konnten sich die cyclischen Formen als "spacer" einlagern. Alle drei "Nicht-Amphiphile" 52 - 54 können also unsymmetrische Membranen bilden, die vor allem bei den Membranen aus Phenolphthalein 52 und Bromthymolblau 53 durch die cyclischen Formen stabilisiert werden. Es ist aber auch vorstellbar, daß BLMS gebildet werden, wobei die anionischen Reste die Kopfgruppen bilden, während die (neutralen) phenolischen Gruppen im Inneren der Membran lokalisiert sind.

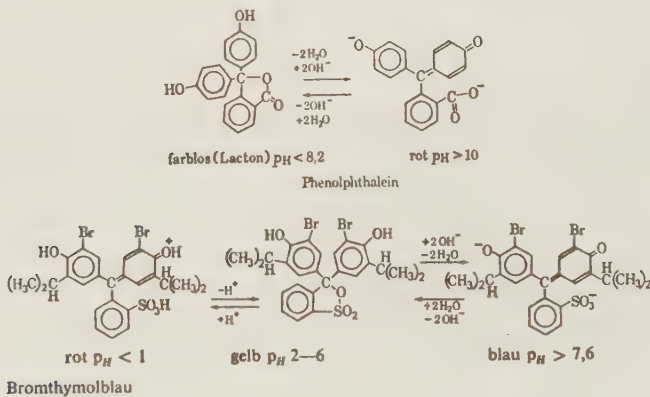


Abb.36: Abhängigkeit der Struktur der pH-Indikatoren Phenolphthalein 52 und Bromthymolblau 53 vom pH-Wert der Lösung.

Die Größe der vesikelähnlichen Carminsäurestrukturen 54 liegt bei etwa 250 Å. Die Strukturen die aus Phenolphthalein 52 bzw. Bromthymolblau 53 gebildet werden sind etwa 5-10 mal so groß, nämlich 1250 - 2500 Å. Die beim Bromthymolblau enthaltenen kleinen sphärischen Gebilde könnten von der nichtcyclischen Verbindung stammen. Sie sind etwa 200-500 Å groß.

5.3.1. Titration einer beschallten Carminsäurelösung

Präpariert man eine Carminsäurelösung 54 ($10^{-3}M$) mittels Beschallung und titriert die beschallte Lösung mit einer 0,01 N NaOH-Lösung, so verschiebt sich das Elektronenspektrum der beschallten Lösung aus 54 langsamer zu größeren Wellenlängen als eine methanolische Referenzlösung. In der Abb.37 sind diese Titrationen enthalten.

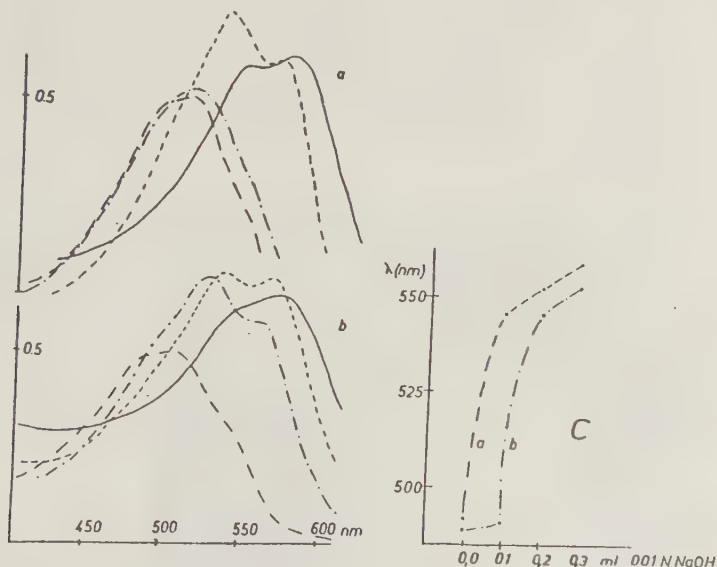


Abb.37: Titration einer $10^{-3}M$ Carminsäurelösung mit Natronlauge;
a) Das Elektronenspektrum einer beschallten Lösung (---) und nach Zugabe von 0,1 ml (- · -), 0,2 ml (---) und 0,3 ml (—) 0,01 N NaOH-Lösung.

b) Zugabe der gleichen Mengen NaOH-Lösung zu einer methanolischen unbeschallten Lösung.

c) Zeitverlauf der Titrationen, dargestellt anhand der längstwelligsten Absorptionsbande. (---) = methanolische Lösung; (- · -) = beschallte Lösung;

Die methanolische Lösung wurde jeweils 1 Minute, die beschallte Lösung wurde jeweils 30 Minuten nach der Zugabe von NaOH gemessen.

Dies war ein Hinweis für das Vorliegen einer Membran. Die Neutralisation über die Membran vollzog sich langsamer als in der methanolischen Referenzlösung.

Nachdem es gelungen war Hinweise für das Vorhandensein einer Membran in beschallten Carminsäurelösungen 54 zu finden, schien es interessant durch Synthese Veränderungen am Molekül vorzunehmen und ihren Einfluß auf die Membranbildung zu studieren. Die einfachste Umsetzung ist die Einführung einer Schutzgruppe für die acht OH-Gruppen der Carminsäure 54. Die Acetat-Schutzgruppen lassen sich auf zwei Wegen einführen:

1. Die Umsetzung mit Acetanhydrid und katalytischen Mengen konz. Schwefelsäure bei Raumtemperatur führt zur Octaacetylcarminsäure 55. Die Reaktion dauert 3 Tage 87.
2. Die Umsetzung mit Acetanhydrid und katalytischen Mengen konz. Schwefelsäure bei 80°C führt neben der Bildung von Octaacetylcarminsäure 55 auch zu wenig Hexaacetylcarminsäure 88. Die Umsetzungen nach den beiden Verfahren führten zu dem gleichen orangeroten Produkt, nämlich der Octaacetylcarminsäure 55, das bei 157°C schmolz.

Die Charakterisierung dieser literaturbekannten Verbindung erfolgte über die Dünnschichtchromatographie in Methanol/Chloroform 3:1. Die Octaacetylcarminsäure 55 war einheitlich. Das Elektronenspektrum in Chloroform belegte die Umsetzung. Im NMR-Spektrum sind die acht Acetylgruppen im Bereich um $\delta = 2$ ppm anzutreffen. Im Massenspektrum nach der FAB-Methode findet sich ein Molpik für einen $(M+Na)^+$ -Cluster bei $m/e: 851$ und die Elementaranalyse bestätigt die Reinheit der Substanz (weitere Daten siehe Kapitel 7.8.).

Eine zusätzliche Absicherung für die Octaacetylcarminsäure 55 wurde durch die Veresterung mit etherischer Diazomethanlösung gewonnen. Der Methylester 56 konnte in 38% Ausbeute isoliert werden. Der Octaacetylcarminsäuremethylester 56 ist dünnschicht chromatographisch einheitlich. Im Protonenresonanzspektrum taucht das Signal für die Methylesterprotonen bei $\delta = 3,95$ ppm als Singulett auf. Im Massenspektrum fehlt der Molpik, aber es taucht ein $(M-CH_3)^+$ -Fragment bei $m/e: 827$ auf. Das Elektronenspektrum in Chloroform ist deutlich verschieden vom Spektrum

des Octaacetats 55 und die Elementaranalyse belegte die Reinheit der Substanz (siehe auch Kapitel 7.8.3.).

Durch die Veresterung der Carminsäure 54 mit Acetanhydrid entstand aus dem unsymmetrischen MLM-Membranbildner eine Verbindung, die mit den normalen doppelschichtigen Vesikelbildnern verglichen werden kann. Das Molekül weist zwei klar getrennte Polaritäten im Molekül auf. Den hydrophoben Teil des Amphiphils 55 bilden hier allerdings nicht die normalen Oligomethylengruppen, sondern veresterte cyclische Gerüste. Die hydrophile Kopfgruppe ist die -COOH-Gruppe. Octaacetylcarminsäure 55 scheint aufgrund seines molekularen Aufbaues zur Vesikelbildung geeignet zu sein. Durch Beschallung von Octaacetylcarminsäure 55 in Wasser lassen sich sehr stabile Vesikellösungen herstellen. Die Konzentration betrug 10^{-4} M an 55. Die Lösung ist orange-rot. In den elektronenmikroskopischen Aufnahmen einer beschallten Lösung des Octaacetats 55 finden sich sehr große Membranstrukturen wieder. Die vesikelähnlichen Gebilde haben einen Durchmesser von 4000-5000 Å. In der Abb.38 sind diese großen Strukturen abgebildet.

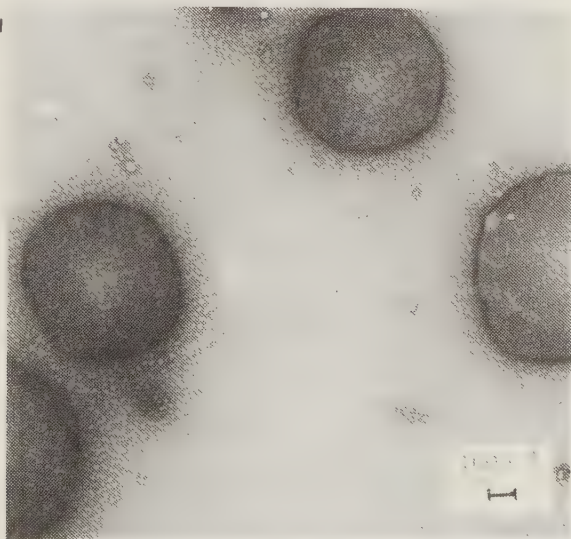
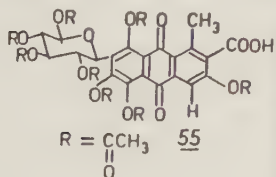


Abb.38: Elektronenmikroskopische Aufnahme einer beschallten Lösung des Octaacetats 55 in Wasser.

Eine Erklärung für die großen Strukturen in dem elektronenmikroskopischen Bild der Octaacetylcarminsäure kann durch die Fusionierung von kleinen vesikelähnlichen Gebilden geliefert werden. Die Kopfgruppe ist nicht geladen und dadurch wird eine Fusion der kleinen Vesikeln bevorzugt.

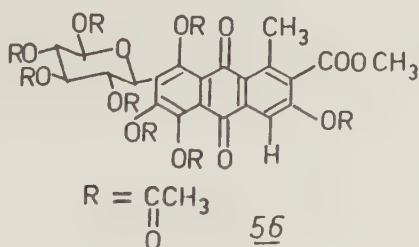
Ein relativ einfacher Nachweis für das Vorliegen einer doppelschichtigen Membran gelang durch die Titration mit verdünnter Natronlauge.

Wenn es sich um eine doppelschichtige Membran handeln sollte, sollte bei der Zugabe von verdünnter NaOH-Lösung nur an der äußeren Oberfläche eine Deprotonierung stattfinden, während die innere Membranoberfläche zunächst unverändert bleiben sollte. Die Carbonsäuren auf der äußeren Oberfläche der Membran werden deprotoniert, dadurch wird das chromophore System vergrößert und die Farbe erleidet eine bathochrome Verschiebung. In Abb.39 ist die Titration dargestellt.



Abb.39: Titration einer beschallten Octaacetylcarminsäurelösung 55 mit 0,01 N NaOH-Lösung; die Zugabe von Triton X 100 zerstört die Membran und führt zu 100% Neutralisation.

Das Spektrum der protonierten Form hat ein Maximum bei $\lambda = 530$ nm. Durch die Titration wurden die äußeren Kopfgruppen deprotoniert; dies ist durch den Shift im Elektronenspektrum zu erkennen. Es liegen die protonierte Form bei $\lambda = 530$ nm und die deprotonierte Form bei $\lambda = 568$ nm zu etwa je 50% nebeneinander vor. Eine Zerstörung der Membran mit Triton X 100 führte zur vollständigen Neutralisation der Kopfgruppen. Am Beispiel des Paares Carminsäure 54 und Carminsäureoctacetat 55 konnte gezeigt werden, daß durch eine einfache Veränderung im Molekül, nämlich der Einführung der Schutzgruppen, sich die Aggregatstruktur drastisch ändert. Aus einer unsymmetrischen MLM-Membran wurde eine BLM-Membran, die zur Fusion neigt.



6. Charakterisierung der Bernsteinsäurevesikeln

Die in den Kapiteln 3. und 4. beschriebenen Bernsteinsäure-amphiphile sollen in diesem Kapitel, auf ihre Fähigkeit Vesikeln zu bilden, untersucht werden.

Zur Charakterisierung von Vesikeln existieren mehrere Verfahren:

1. Ultrazentrifuge, Gelchromatographie und Dialyse dienen vor allem der Homogenisierung, der kontrollierten Bildung und der Abtrennung von Monomeren bei Einschlußexperimenten. Diese Methoden wurden z.B. beim Einschluß von Magnesium-octaethylporphyrin (siehe Kapitel 6.3.) oder bei der Dialyse der Phosphat-vesikeln aus 48 angewandt.
2. Die NMR-Spektroskopie erlaubt die Bestimmung der Phasenübergangstemperatur, des Verhältnisses innen/außen und Aussagen über die Beweglichkeit der Vesikelbausteine. Das Verhältnis innen/außen konnte nicht ermittelt werden, da der Zusatz von Verschiebungsreagentien zur Ausfällung der Vesikeln führte. Temperaturabhängige NMR-Spektren sind im Kapitel 6.5. beschrieben.
3. Die Unsymmetrie von Vesikeln kann auch mit der Metachromasie (siehe Kapitel 6.2.), Reaktionen an den Vesikeloberflächen und mit asymmetrischen Strom-Spannungskurven (siehe Kapitel 2.3.) überprüft werden.
4. Die Elektronenmikroskopie erlaubt die direkte Sichtbarmachung der sphärischen Aggregate mittels verschiedener Techniken. In den Kapiteln 6.1. und 5.2.1. sind die elektronenmikroskopischen Untersuchungen zusammengefasst.

Dies ist nur eine Auswahl der bisher angewandten Verfahren. Es können nicht alle Verfahren ⁸⁹ auf ein bestimmtes Amphiphil angewandt werden, da die einzelnen Methoden an bestimmte strukturelle Voraussetzungen im Molekül gebunden sind.

In der Literatur sind viele verschiedene Techniken zur Vesikelpräparation aufgeführt:

1. "handgeschüttelte" Liposomen 90
2. Ultrabeschallung von wässrigen Lipiddispersionen oder Lipid-

filmen 91

3. Injektionsmethoden 92

4. "Reverse phase evaporation" 93

5. Detergenz Gelfiltration 94

6. Konventionelle Detergenz Dialyse 95

7. Kontrollierte Detergenz Dialyse mit der Lipoprep-Apparatur 96

Trotz dieser Fülle an Verfahren wurde bei den synthetischen Vesikeln fast ausschließlich die Beschallungsmethode gewählt, um Membranen zu bilden. Der geringe Zeitaufwand für die Präparation gleicht gewisse Nachteile der Methode aus, zumal die Heterogenität der Vesikelgröße eine Funktion der Beschallungszeit ist. Beschallungszeiten zwischen 30 und 60 Minuten lieferten relativ homogene Vesikeln. Die verbliebene Heterogenität kann durch Gelchromatographie und Ultrazentrifugation verringert werden.

Bei der Beschallung wendet man normalerweise zwei Modifikationen an:

Bei der Suspensionsmethode wird das Amphiphil in Wasser oder Pufferlösung suspendiert und anschließend beschallt. Bei der zweiten Methode wird einem, durch Evaporieren erzeugten, Lipidfilm Wasser zugesetzt und dann beschallt. Bei beiden Verfahren entstehen klare bis leicht opaleszierende Lösungen. Für Einschlußexperimente ist die Lipidfilm-Methode vorzuziehen.

6.1. Elektronenmikroskopie an Bernsteinsäurevesikeln

Die Präparationstechnik der Proben für die elektronenmikroskopischen Aufnahmen muß gewährleisten, daß die Bläschenstruktur des Aggregates erhalten bleibt. Die "negative Kontrastierung" mit Schwermetallsalzen 97 schützt die Struktur vor dem Kollabieren und ermöglicht ein hohes Maß an Auflösung. Die Herstellung der Proben ist im Kapitel 7.10.2. beschrieben. Im folgenden werden die elektronenmikroskopischen Aufnahmen der doppelschichtigen und monoschichtigen Bernsteinsäure-amphiphile abgebildet und diskutiert. Die elektronenoptische Vergrößerung beträgt 1:40 000.

Das Sulfobernsteinsäureamphiphil 24 (siehe Kapitel 3) bildet multilamellare Vesikeln aus. Die in Abb.40 dargestellten Vesikeln sind sehr einheitlich und haben einen Durchmesser von 2500 Å.

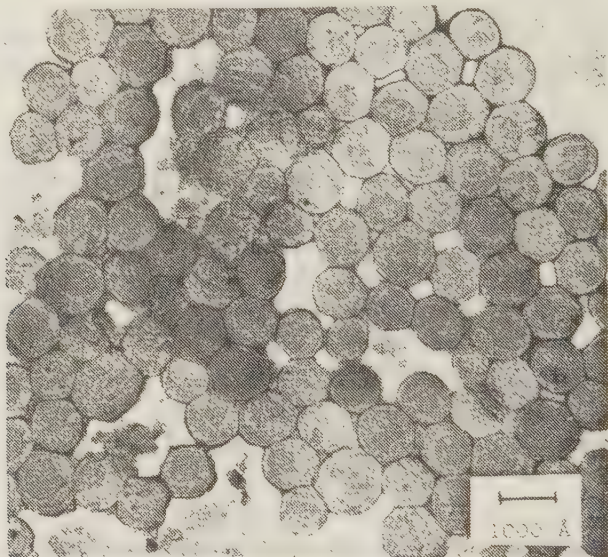


Abb.40: Elektronenmikroskopische Aufnahme von multilamellaren Vesikeln des Sulfobernsteinsäuredihexadecylesters 24.

Die Multilamellarität der Vesikeln kann durch intercalierte Wasserbereiche erklärt werden.

Das Thiosuccinataddukt 25, das Thiolactataddukt 26 und das Thiodioladdukt 27 (siehe Kapitel 3.) bilden doppelschichtige Vesikeln mit Durchmessern von 200-500 Å. Diese Vesikeln sind am Beispiel der Thiodiolverbindung 27 in Abb.41 dargestellt. Diese Größenverteilung taucht auch bei Lecithinvesikeln auf. Eine Vesikellösung des Thiosuccinatadduktes 25 mit einem pH-Wert von 2 enthält neben kleinen 200-300 Å großen Vesikeln, auch große etwa 1000 Å-Vesikeln, die man sich durch Fusion der kleinen Vesikeln erklären kann, In Abb,42 sind diese Vesikeln abgebildet.

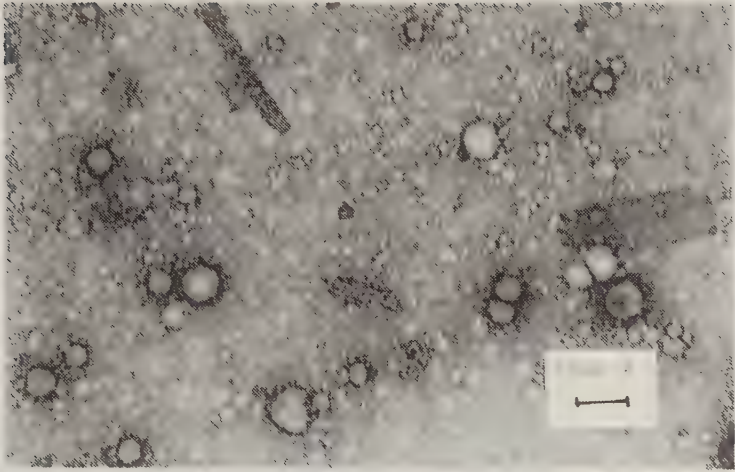


Abb.41: Elektronenmikroskopische Aufnahme einer 10^{-4} M Vesikellösung des Thiodioladduktes 27.

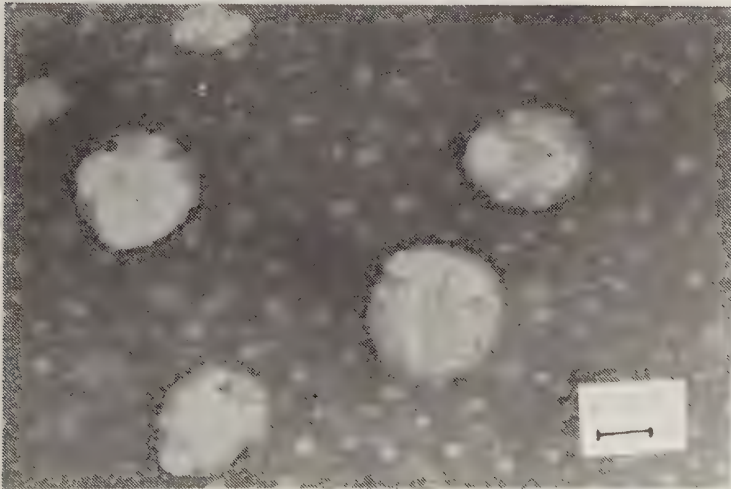


Abb.42: Elektronenmikroskopische Aufnahme einer 10^{-4} M Vesikellösung des Thiosuccinatadduktes 25. Die großen Vesikeln entstehen durch Fusionierung der kleinen Vesikeln.

Der Übergang von den doppelschichtigen Vesikeln zu Vesikeln, die aus symmetrischen Bolaamphiphilen hergestellt wurden, veränderte die Struktur der Aggregate. Symmetrische Bolaamphiphile, wie das Sulfo-Diaddukt 29 und die Thioacetat-Diaddukte 30 - 32, bilden ohne Zusätze Vesikelmembranen aus. Dies stellt einen Unterschied zu den bisher in der Literatur beschriebenen MLM-Vesikelbildner dar, die im allgemeinen nur mit Zusätzen, wie Cholesterin, Vesikeln ausbilden.

Bei dem Sulfo-Diaddukt 29 (siehe Kapitel 4.) konkurriert die Vesikelbildung noch mit anderen Aggregatformen. Wie aus der Abb.43 zu ersehen ist, treten drei Morphologien der Aggregate auf.

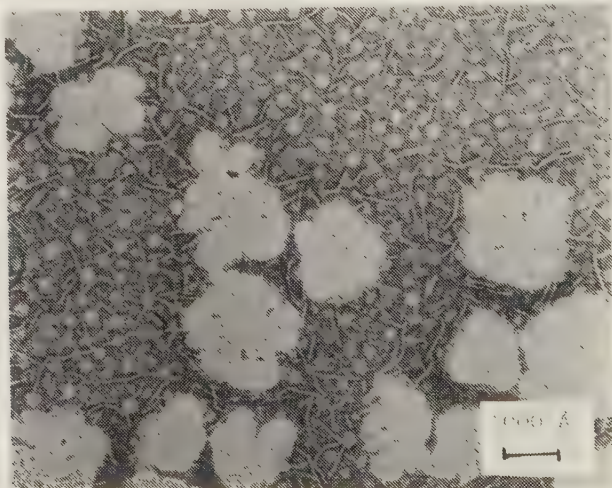


Abb.43: Elektronenmikroskopische Aufnahme einer 10^{-4} M beschallten Lösung des Sulfo-Diadduktes 29

Auf der Abb.43 sieht man kleine, etwa 300 Å große Vesikeln, deren Kurvatur durch unterschiedliche Hydratation der äußeren und inneren Kopfgruppen entstehen könnte. Außerdem sind große Aggregate aus diesen kleinen Vesikeln zu erkennen. Normalerweise sollten geladene Vesikeln ohne Zusatz von Ca^{2+} -Ionen nur schwach aggregieren. Die gegenseitige Abstoßung der geladenen Kopfgruppen könnte durch die Hydrathülle des Dipols Wasser verringert werden,

so daß es zu einer erhöhten Aggregation kommen kann. Die dritte Struktur, die in Abb.43 enthalten ist, sind etwa 800-1000 Å lange und 100 Å dicke Röhren. Da die Länge eines Sulfo-Diadduktamphiphils 29 im Kalottenmodell etwa 27 Å entspricht, könnte man sich die Röhren, wie in Abb.44 wiedergegeben, aus zwei Sulfo-Diaddukt-Molekülen zusammengesetzt vorstellen. Zwischen den beiden Amphiphilen würde sich eine etwa 50 Å breite Wasserschicht befinden.

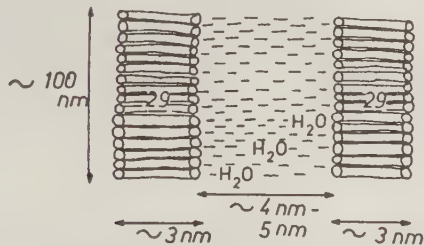


Abb.44: Modell für die Röhrenstruktur bei Sulfo-Diaddukten 29

Bei der Röhrenstruktur könnte es sich um den nematischen Phasen bei Flüssigkristallen ähnelnde Gebilde handeln 98.

Am Beispiel des Thioacetat-Diadduktes 30 soll der Einfluß des pH-Wertes und von Zusätzen auf die Vesikelbildung untersucht werden.

Bei pH 7 liegen, wie aus Abb.45 hervorgeht, isolierte Vesikeln mit Durchmessern von 300-1000 Å vor. Bei diesem pH-Wert sind die COOH-Gruppen deprotoniert und es liegen geladene Vesikel vor, die sich gegenseitig abstoßen. Eine Erniedrigung des pH-Wertes auf 4,5 führt zu stark aggregierten Vesikeln. Dies ist in Abb. 46 wiedergegeben. Durch die Protonierung wird die Ladung der Kopfgruppen aufgehoben und es bilden sich Wasserstoffbrückenbindungen aus, die die Vesikeln stabilisieren und zudem eine vermehrte Aggregation der Vesikeln induzieren.

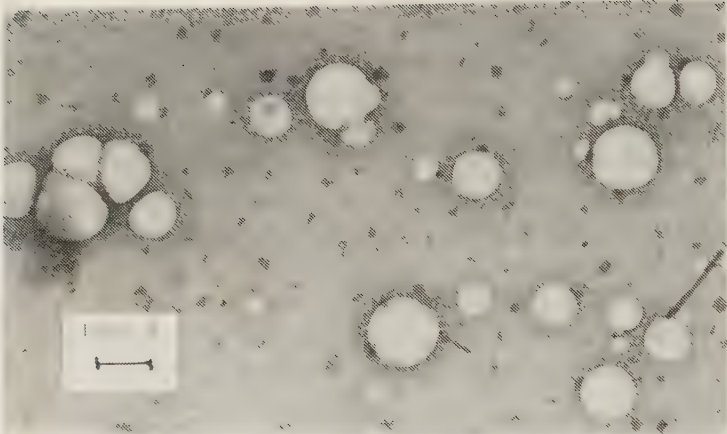


Abb.45: Elektronenmikroskopische Aufnahme einer Vesikellösung des Thioacetat-Diadduktes 30 bei pH 7. Es liegen isolierte Vesikeln vor.

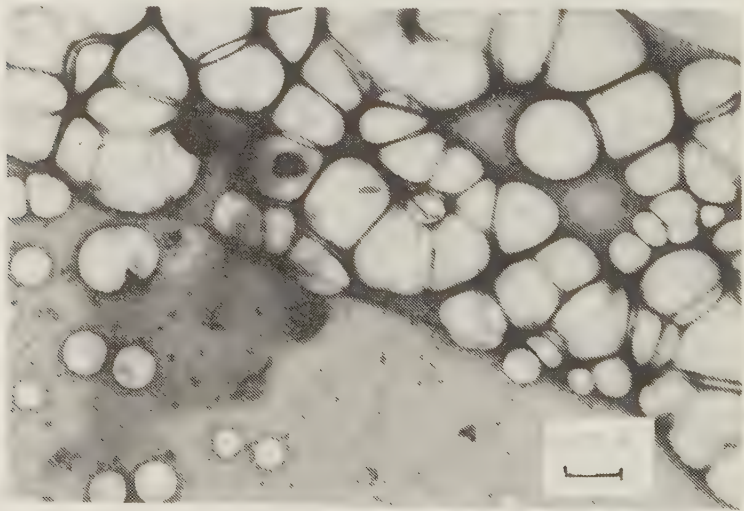


Abb.46: Elektronenmikroskopische Aufnahme einer Vesikellösung des Thioacetat-Diadduktes 30 bei pH 4,5. Es kommt zur vermehrten Aggregation der Vesikeln.

An dieser Stelle könnte man einwenden, daß es sich bei den Strukturen um Mizellen handeln würde. Nach Bachmann et al. 99

kann aber die normale Elektronenmikroskopie wenig zur Charakterisierung mizellarer Systeme beitragen, da Mizellen nur in ständiger Wechselwirkung mit dem monomeren Tensid und dem Lösungsmittel, z.B. Wasser, existieren. Nur spezielle Präparationsmethoden, wie die extrem schnelle Kältefixierung, gestatten eine Aufnahme mizellarer Aggregate. Daher sollte es sich bei den symmetrischen Bolaamphiphilen um Vesikeln handeln. Es wäre natürlich auch möglich, daß sich Mizellen aus monoschichtigen Amphiphilen, wie dem Thioacetat-Diaddukt 30 gänzlich anders verhalten, wie die einfachen Mizellenbildner. Die Größe der Aggregate spricht aber eindeutig gegen Mizellen.

Das Thioacetat-Diaddukt 31, mit einer um zwei C-Atome kürzeren Kette, ist in der Salzform zu gut wasserlöslich und elektronenmikroskopisch lassen sich keine geordneten Strukturen erkennen. Bei pH 4,5 bildet die weitgehend protonierte Form des Thioacetat-Diadduktes 31 ähnliche Aggregate, wie die Verbindung 30 bei gleichem pH-Wert. Das längerkettige Thioacetat-Diaddukt 32 ist schlecht wasserlöslich. Bei Beschallung eines Lipidfilmes in bidestilliertem Wasser bilden sich die gleichen Strukturen wie bei der Verbindung 30.

Zweiwertige Kationen, wie z.B. Zn^{2+} , führen zu einer sehr starken Aggregation der Vesikeln der Thioacetat-Diaddukte 30-32. In den elektronenmikroskopischen Aufnahmen lassen sich die einzelnen Vesikeln nur noch schwer identifizieren (ohne Abb.). Vergleicht man die negativ gefärbten und die gefriergeätzten Aufnahmen des Thioacetat-Diadduktes 30 mit und ohne MgOEP miteinander, so fällt auf, daß die Vesikeln mit MgOEP-Zusatz trotz sonst gleicher Bedingungen bei der Präparation sehr viel größer sind. In der Abb.47 sind die elektronenmikroskopischen Aufnahmen der gefriergeätzten Thioacetat-Diaddukt-Vesikellösungen 30 mit und ohne Zusatz wiedergegeben. Eine Erklärung für die sehr viel größeren MgOEP/Thioacetat-Diaddukt-Vesikeln wäre, daß die Einlagerung des Porphyrins in die symmetrische Membran die Krümmung erniedrigt und dadurch die Vesikeln größer werden.

Eine Überlegung zu der Erniedrigung der Kurvatur bei dem Einbau von MgOEP 59 in die Thioacetat-Diaddukt-Vesikeln 30 ist in den Abb. 47 c und d dargestellt. Durch den Einbau von etwa 10% 59 in die Vesikeln, kommen mit einem MgOEP-Molekül jeweils etwa 6 Bolaamphiphile direkt in Kontakt. Durch hydrophobe Wechselwirkungen verlieren diese Vesikelbausteine ihre Kurvatur. Die restlichen Bolaamphiphile, die nicht mit 59 in Berührung kommen, behalten ihre Kurvatur. Da mehr als 50% der Bolaamphiphile von der Wechselwirkung betroffen sind, wird die Kurvatur stark erniedrigt, geht aber nicht ganz verloren, so daß sich große Vesikel bilden können.

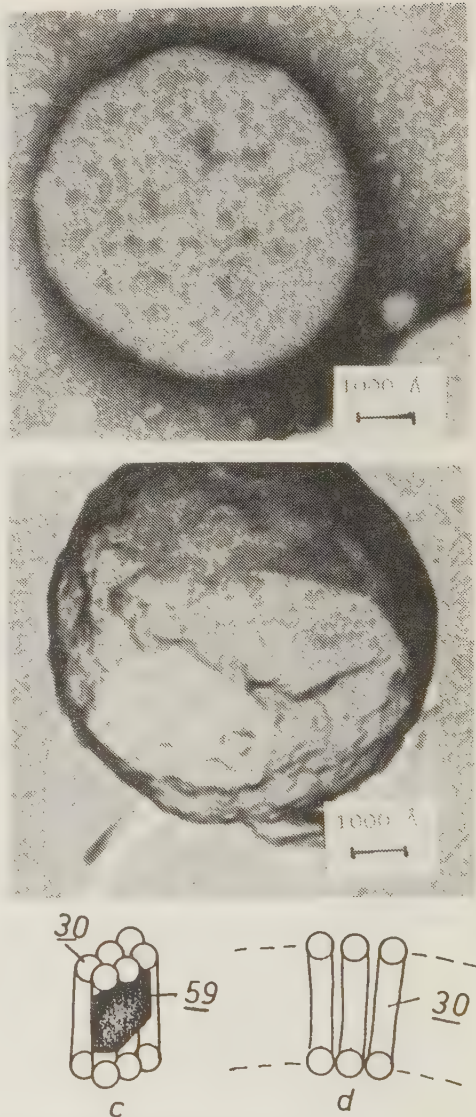


Abb.47: a) Elektronenmikroskopische Aufnahme eines in Wasser/Glyzerin 70:30 beschallten Lipidfilms aus dem Thioacetat-Diaddukt 30 und MgOEP 59. Negativ anfärbt; b) wie a), aber gefriergetätzte Aufnahme; c) Beim Einbau von 59 in Vesikeln aus 30 treten etwa 6 Bolaamphiphile mit 59 in direkten Kontakt. d) Kurvatur bei symmetrischen Bolaamphiphil-Vesikeln entsteht dadurch, daß innen weniger Platz für Kopfgruppen und hydrophoben Teil vorhanden ist als außen.

Interessante Strukturen tauchen in den Aufnahmen des Thiodiol-Diadduktes 34 auf. Ohne Zusätze bilden sich ovale Strukturen aus. Diese ovalen Gebilde zeigt Abb.48.

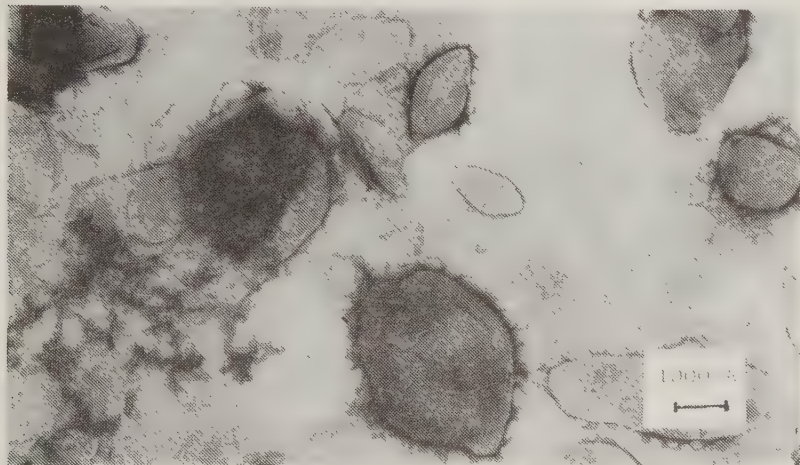


Abb.48: Elektronenmikroskopische Aufnahme einer 10^{-4} M beschallten Lösung des Thiodiol-Diadduktes 34.

Die ovalen Vesikeln sind etwa 1000-3000 Å groß. Im Hintergrund sind auch kleinere Strukturen zu erkennen. Da die Köpfe ungeladen sind, ist die hohe Aggregation erklärbar. Das Kontrastmittel wird außerdem schlechter angenommen als bei den geladenen Vesikeln. Ein Zusatz von z.B. Pyridinium-malonyldimethylester bei der Beschallung erniedrigt die Kurvatur beträchtlich und es resultieren daraus langgestreckte, astartige Strukturen, wie sie Abb.49 zeigt. Bei diesen astartigen Strukturen könnte es sich wieder, um den nematischen Phasen der Flüssigkristalle ähnelnde Gebilde handeln.

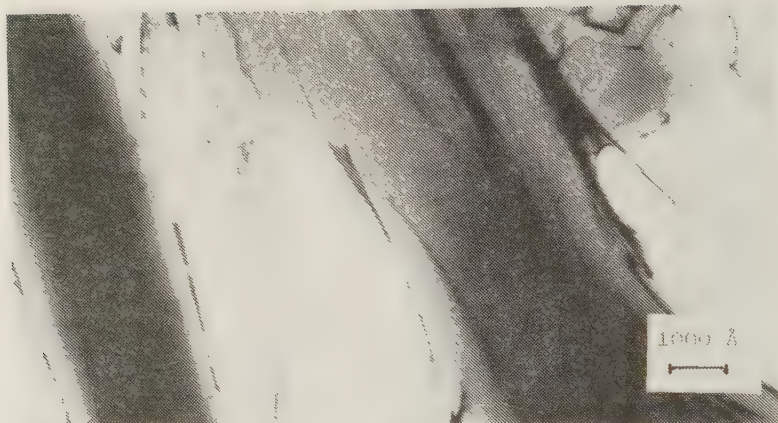


Abb.49: Elektronenmikroskopische Aufnahme einer beschallten Thiodiol-Diaddukt-Lösung 34 mit Zusatz von 10% Pyridinium-malonyldimethylester. Es bilden sich langgestreckte, astartige Strukturen.

In den elektronenmikroskopischen Aufnahmen der Thiosuccinat-Diaddukt-Vesikellösungen sind die gleichen kettenförmigen Aneinanderreihungen wiederzufinden, wie sie bei den Thioacetat-Diaddukt-Aufnahmen (siehe Abb.46) auftreten. Das Thiosuccinat-Diaddukt 35 ist in der Salzform gut wasserlöslich und bildete erst nach dem Ansäuern diese typische kettenförmige Aneinanderreihung der Vesikeln mit -COOH-Kopfgruppen (ohne Abb.). Es bleibt noch die Besprechung der elektronenmikroskopischen Aufnahmen der unsymmetrischen Bernsteinsäuretetrolide 38 und 40 übrig. Die unsymmetrischen Bernsteinsäuretetrolide 38 und 40 bilden bei pH 4 Mikrovesikeln mit etwa 200-300 Å Durchmesser. Die Vesikeln sind von relativ einheitlicher Größe und zeigen auch eine teilweise Aggregation, die durch die -COOH-Gruppen induziert wird. Wegen der starken Kurvatur werden im Gegensatz zu den symmetrischen Bolaamphiphilen, wie z.B. dem Thioacetat-Diaddukt 30, keine großen Vesikeln gebildet, sondern nur Mikrovesikeln. Bei pH 7 sind lamellare Strukturen zu erkennen (ohne Abb.). In der Abb.50 ist eine Aufnahme von Mikrovesikeln

der unsymmetrischen Verbindung 38 wiedergegeben.

Die unsymmetrische Bernsteinsäureverbindung 40 ist oberhalb pH 5,5 recht gut wasserlöslich. Es bilden sich daher keine geordneten Strukturen aus. Im sauren Milieu bilden sich analog zur Verbindung 38 Mikrovesikeln mit etwa 200 Å Durchmesser aus.

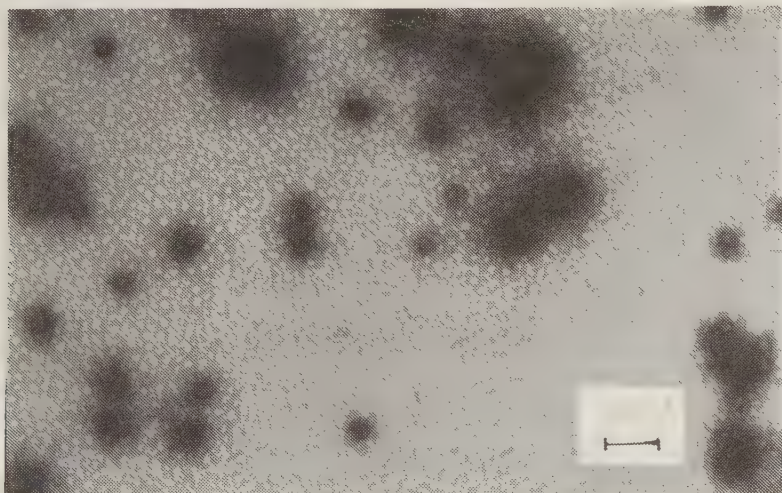


Abb.50: Elektronenmikroskopische Aufnahme von Mikrovesikeln aus dem unsymmetrischen Bolaamphiphil 38 bei pH 4.

Im stärker sauren Milieu (pH 2) bildeten sich die gleichen Strukturen aus.

Zusammenfassend kann man sagen, daß die symmetrischen und unsymmetrischen Bernsteinsäuretetrolide Vesikel ausbilden. Die symmetrischen bilden große Vesikeln aus, die unsymmetrischen kleine. Die Struktur der Aggregate kann durch Zusätze und pH-Änderung variiert werden.

Nachdem es gelungen war mit der Elektronenmikroskopie die erfolgreiche Vesikelbildung zu dokumentieren, mußten die Vesikeln durch weitere Untersuchungen charakterisiert werden. Wie in Abb.51 zu sehen ist, kann man eine Vesikel in neun Regionen aufteilen.

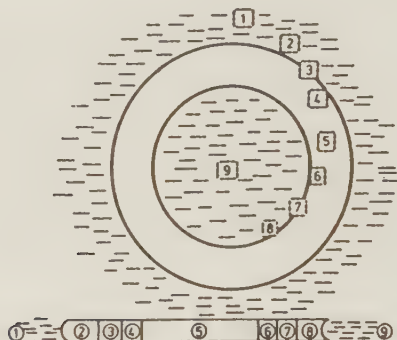


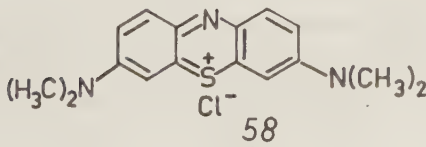
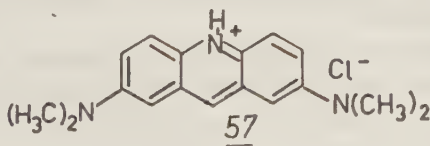
Abb.51: Die neun Regionen in Vesikellösungen. ¹⁰⁰
 1 das äußere Wasservolumen (Hauptvolumen, besser bekannt unter engl. bulk), 2 die wässrige Umgebung der Kopfgruppen (Hydratationssphäre, Gouy-Chapman-Schicht), 3 die äußeren Kopfgruppen, 4 die hydrophobe Membran nahe den äußeren Kopfgruppen, 5 das Innere der hydrophoben Membran (bei Doppelschichtmembranen läßt sich diese Region wiederum in eine innere und eine äußere Hälfte unterteilen), 6 - 9 die inneren Regionen, die den äußeren Regionen 4 - 1 entsprechen. Die Volumina der hydrophoben Membran 5 und des eingeschlossenen Wasserraums sind bei Mikrovesikeln (Durchmesser 500 Å, Konzentration ≤ 1 mM) wenigstens hundertmal kleiner als das "bulk".

Zur Charakterisierung der Vesikeln wurden hier vor allem die Wechselwirkung der Kopfgruppen (Regionen 2 und 3) mit Farbstoffen, wie Acridinorange 57 und Methylenblau 58, (Metachromasie, siehe Kapitel 6.2.) und die regioselective Einlagerung von Magnesiumoctaethylprophin (MgOEP) 59 in Region 5, sowie der Einschluß von Substraten in Region 9, untersucht.

6.2. Metachromasie 101

Bei der unsymmetrischen monoschichtigen Vesikel 38 (siehe Kapitel 4.2.) stellt sich die Frage, ob sich die Kopfgruppen so anordnen, daß die kleinere Kopfgruppe nach innen orientiert ist und die größeren Köpfe die äußere Oberfläche der Vesikeln bilden oder ob eine statistische Verteilung vorliegt. Enthält die Membran, wie bei der Verbindung 38 verschiedene pH-abhängige saure Kopfgruppen, könnte die Ausrichtung ermittelt werden, wenn es gelänge die verschiedenen pH-abhängigen Gruppen selektiv nebeneinander zu titrieren. Ein Nachteil ist, daß Protonenübertragungsreaktionen sich auch über Membranen relativ schnell vollziehen, so daß aus langsamen Titrationsen in der Regel keine Rückschlüsse über die Orientierung gezogen werden können. In der Literatur sind Titrationsen von langkettigen Carbonsäuren und Sulfonsäuren nur im nichtwässrigen Milieu beschrieben und deshalb nicht auf Vesikeln zu übertragen, die aus wässriger Lösung untersucht werden 102.

Aus der Analytik an anionischen und kationischen Tensiden wurden Methoden entwickelt die Bestimmung der Tenside über die Komplexierung von den Tensiden mit gegensinnig geladenen Farbstoffen zu ermitteln 103,104. Für anionische Tenside wurde die Methylenblau- bzw. die Acridinorange-Methode entwickelt. Die Komplexe wurden im nichtwässrigen Milieu gefällt und die Menge an Tensid bestimmt.



Stefano Massari und Donatella Pascolini 105 übertrugen diese Methode ins wäßrige Milieu. Sie untersuchten die Verteilung von Phosphatidinsäure auf der äußeren Oberfläche von gemischten Lecithin-Phosphatidinsäure-Vesikeln. Aus anderen Arbeiten über die Wechselwirkung zwischen Methylenblau 58 bzw. Acridinorange 57 und Polyanionen war bekannt, daß typische Phänomene auftreten 106,107. Die kurzwellige Verschiebung der Hauptabsorptionsbande von 490 nm auf 470 nm und das Auftauchen von isosbestischen Punkten sind typische Merkmale für die Acridinorange-Polyanion-Wechselwirkung. Dieses sogenannte metachromatische Verhalten dieses oder ähnlicher Farbstoffe wird zurückgeführt auf die verstärkte Ausbildung von Farbstoffdimeren an aggregierten Systemen. Für die Untersuchung müssen bestimmte Verhältnisse zwischen Farbstoff und Vesikeln eingehalten werden. Große Überschüsse an einer der beiden Komponenten lassen den metachromatischen Effekt verschwinden. Es taucht dann im VIS-Spektrum entweder nur die Dimeren- oder die Monomerenbande auf.

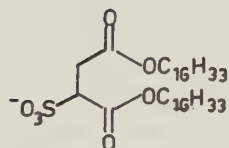
Man verwendet die Farbstoffe Methylenblau 58 und Acridinorange 57 aus folgenden Gründen:

1. Ihre Struktur ist sehr ähnlich und daher lassen sich die spektrometrischen Befunde leicht vergleichen.
2. Die Änderungen in der Absorption bei einer Farbstoff-Polyanion-Wechselwirkung sind sehr stark.
3. Das Spektrum der kationischen Form des Farbstoffes ist nicht pH-abhängig.
4. Der größtmögliche Abstand zwischen nächsten Farbstoffnachbarn bei dem noch Absorptionsänderungen auftreten, ist für Methylenblau 58 geringer als für Acridinorange 57.

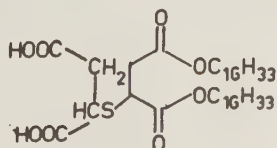
Die Anwendung dieser Methode auf die Vesikellösung der unsymmetrischen Verbindung 38 zur Ermittlung der Orientierung der Kopfgruppen ist im folgenden Abschnitt beschrieben.

Die große Kopfgruppe des unsymmetrischen Diadduktes 38 hat ungefähr dieselbe Länge und Breite wie das hydrophobe Gerüst, weil beide Bernsteinsäurederivate 108 sind, die über eine Schwefelbrücke verbunden sind. Die Sulfonsäure auf der anderen Seite des Makrocyclus kann als Scheibe mit dem Durchmesser 6 Å angesehen werden 109. Das Verhältnis der Oberflächen der beiden Kopfgruppen ist ca. 2:1, wenn man sich die Bernsteinsäure-Kopfgruppe parallel zur Membranoberfläche orientiert denkt. Sie kann unabhängig vom hydrophoben Teil um die C-S-Bindung rotieren. Ihre effektive Oberfläche ist kleiner, wenn man sie schräg gegen die Kettenebene orientiert ansieht 110.

Die Beschallung des unsymmetrischen Bernsteinsäuretetrolid-diadduktes 38 in bidestilliertem Wasser bei pH 4 lieferte Mikrovesikeln (siehe Kapitel 6.1.) mit einer durchschnittlichen Größe von 200 Å. Man kann annehmen, daß die Verbindung 38 monoschichtige Membranen ausbildet, deren Schichtdicke etwa 20 Å beträgt. Das Verhältnis der inneren zur äußeren Oberfläche ist ca. 5:3, und man kann eine unsymmetrische Orientierung der Kopfgruppen voraussagen. Der Beweis für die angenommene Verteilung, Thiobernsteinsäure außen und Sulfonsäure innen, ergab sich aus der Untersuchung des metachromatischen Effektes. Die selektive Titrierbarkeit der Carbonsäuren und der Sulfonsäuren wurde zuerst an doppelschichtigen Vesikelmembranen, die aus dem Sulfobernsteinsäuredihexadecylester 24 bzw. aus dem Thiobernsteinsäureaddukt 25 hergestellt wurden, untersucht.



24



25

BLM-Vesikeln wurden hergestellt aus Bernsteinsäuredicylestern, die Sulfonsäure- 24 oder Thiobernsteinsäure-Kopfgruppen 25 enthalten. Bei pH 7 zeigten beide Vesikeln starke spektrale Änderungen, wenn ihre wäßrigen Lösungen zu einer Acridinorange- 57 bzw. zu einer Methylenblaulösung 58 zugegeben werden. Die Verhältnisse Farbstoff zu Vesikeln werden dabei zwischen 1:1 und 1:10 variiert. Die Grenzverhältnisse sind in der Abb. 52 wiedergegeben.

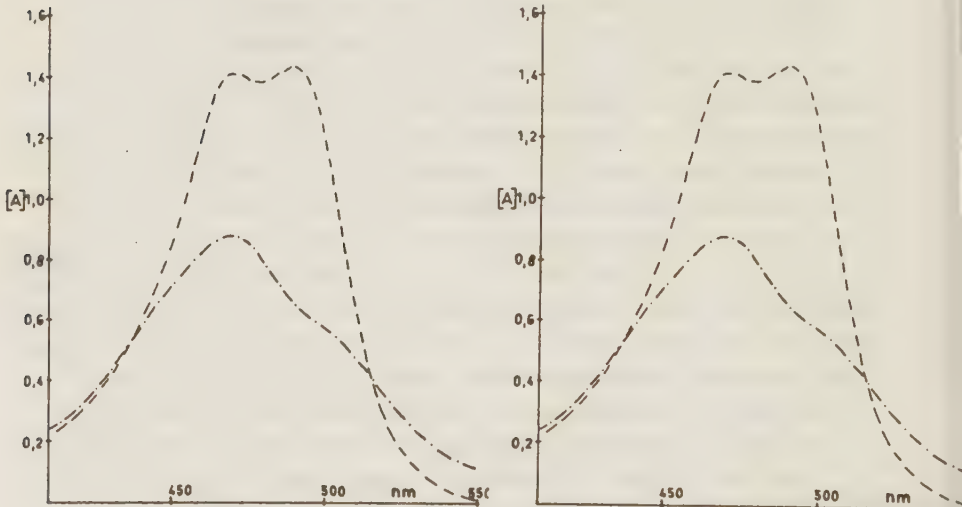


Abb.52: a) Acridinorange 57 ($1\mu\text{M}$ in 15 ml) (----) und in Gegenwart von Sulfonsäurevesikeln aus 24 ($10,4\mu\text{M}$ in 15 ml) (-.-.). Beide in Wasser pH 7.

b) Das gleiche System wie a) aber mit der Thiobernsteinsäure-Vesikel aus 25 (-.-.). Beide in Wasser pH 7.

Bei einem Verhältnis 1:10 von Farbstoff zu Vesikeln aus dem Sulfonsäurederivat 24 oder dem Thiobernsteinsäurederivat 25 wird die Absorption der 490 nm-Bande um etwa 60% erniedrigt.

Bei pH 2 bleibt der Effekt durch die Sulfonsäure-Vesikeln aus 24 der gleiche, während die Thiobernsteinsäureverbindung 25 protoniert ist und ihre Vesikeln keinen Einfluß auf das Acridinorange-Spektrum haben. Experimente mit dem Farbstoff Methylenblau liefern das gleiche Ergebnis. In der Abb.53 sind die Grenzverhältnisse für die Acridinorange/Vesikel-Titrationsen bei pH 2 aufgeführt.

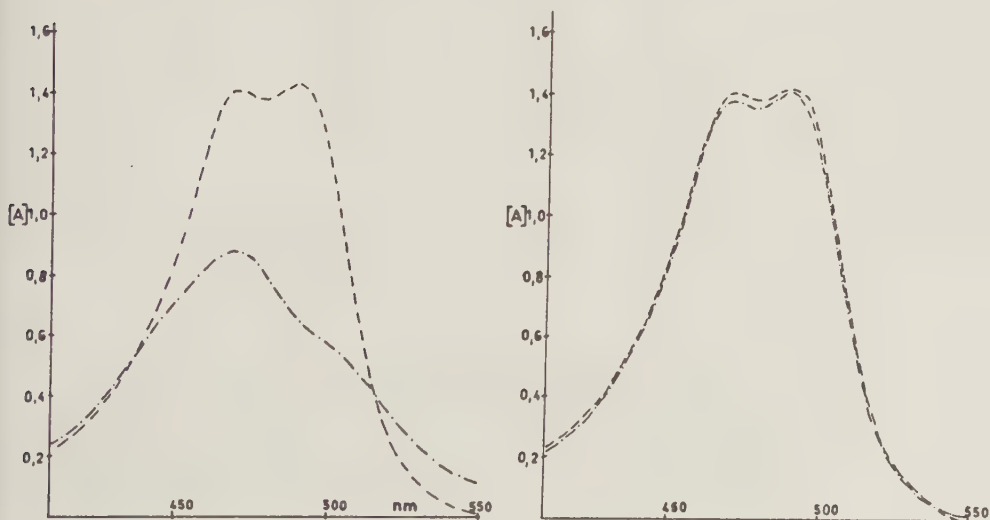


Abb.53: a) Acridinorange 57 ($1\mu\text{M}$ in 15 ml) (---) und in Gegenwart von Sulfonsäurevesikeln aus 24 ($10,4\ \mu\text{M}$ in 15 ml) (-.-.). Beide in HCl pH 2.

b) Das gleiche System wie a) aber mit der Thiobernsteinsäure-Vesikel aus 25 (-.-.-). Bei pH 2 tritt keine Änderung der Absorption des Farbstoffes 57 auf.

Dann wurden gemischte Vesikeln hergestellt, die 95, 90 oder 80% an der Thiobernsteinsäureverbindung 25 und 5, 10 oder 20% an der Sulfonsäureverbindung 24 enthielten. Der metachromatische Effekt war proportional der zugegebenen Menge an Sulfonsäure-amphiphil 24. Dies zeigt Abb.54.

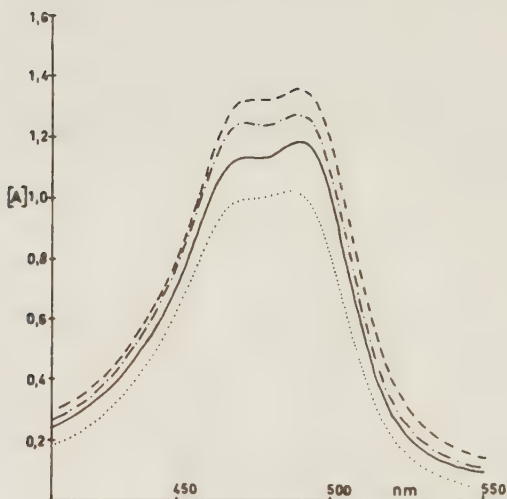


Abb.54: Acridinorange 57 in HCl (pH 2): mit Vesikeln aus dem Thiobernsteinsäureamphiphil 25 (---) und Mischungen aus 25 und dem Sulfonsäureamphiphil 24: 95:5 (-.-.), 90:10 (—) und 80:20 (...). Die 90:10 Probe ist vergleichbar mit der Abb.55b (-.-.), wo zehn Prozent Sulfonsäurevesikel-Zugabe 24 den gleichen Effekt erzielen. Die 5% -Kurve (-.-.) zeigt an, daß der Sulfonsäurevesikel-Zusatz 24 leicht bis zu dieser Zugabe identifiziert werden kann.

Die MLM-Vesikeln, die aus dem unsymmetrischen Bolaamphiphil 38 hergestellt wurden, wurden dann unter den gleichen Bedingungen untersucht. Es wurde keinerlei Verschiebung der Absorptionsbande bei 490 nm beobachtet. Stellt man dagegen Mischvesikeln aus 38 und der Sulfoverbindung 24 her, so wird wieder eine Abnahme der 490 nm-Bande entsprechend der zugegebenen Menge beobachtet. Dies ist in der Abb.55 wiedergegeben.

Aus den Ergebnissen der Titrationen läßt sich ableiten, daß keine oder weniger als 2% der Sulfonsäure-Kopfgruppen von 38 sich auf der äußeren Oberfläche der unsymmetrischen MLM-Vesikeln

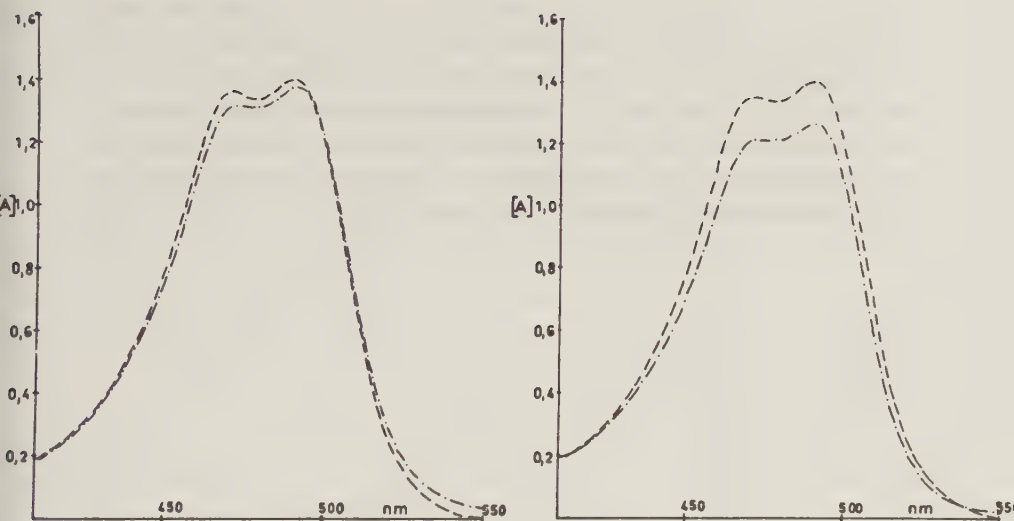


Abb.55:a) Acridinorange 57 ($1 \mu\text{M}$ in 15 ml) in HCl $\text{pH } 2$ (---) und nach Zugabe von $3,5 \mu\text{M}$ der MLM-Vesikel aus 38 (- - -); die geringere Extinktion wird von der Verdünnung verursacht.

b) Das gleiche System wie unter a) mit der Ausnahme, daß 10% des Sulfonsäureamphiphils 24 bei der Vesikelpräparation zugegeben wurden.

befinden. Dies ist meines Wissens die erste erfolgreiche Synthese einer vollständig unsymmetrischen Vesikelmembran. Aus Titrationsexperimenten ergab sich demnach, daß (innerhalb der Meßgenauigkeit) alle (großen) Thiobernsteinsäuregruppen außen lagen, während alle (kleinen) Sulfonsäurereste innen lagen. Daraus ergibt sich auch sofort die Einschichtigkeit der Membran. Bei einer ebenfalls denkbaren BLM, bei der alle Moleküle gebogen vorliegen (siehe Bild), müßten mehr als 50% der Sulfonsäuregruppen außen liegen.

Bei den metachromatischen Experimenten an Vesikeln aus dem Sulfobernsteinsäureamphiphil 24, dem Thiobernsteinsäureamphiphil 25 und dem unsymmetrischen Bolaamphiphil 38 konnte durch eine Temperaturerhöhung keine signifikante Erhöhung oder Verschiebung der Absorption festgestellt werden bei Farbstoff-Vesikel-Systemen (1:7) für die doppelschichtigen Membranen bzw.

bei dem Acridinorange 57 - Vesikel-System (1:3) für die unsymmetrische monoschichtige Vesikeln aus 38. T.Kunitake et al.¹¹¹ beschreiben eine temperaturabhängige Absorptionsänderung von Cyaninfarbstoffen die an synthetische BLM-Vesikeln gebunden werden. Nur bei der Wechselwirkung zwischen Vesikeln aus der Sulfoverbindung 24 und Acridinorange 57 zeigte sich die in Abb. 56 wiedergegebene Änderung der Absorption.

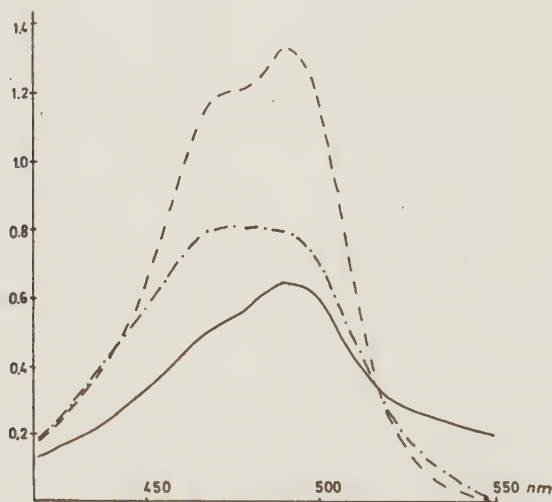


Abb.56: Temperaturabhängigkeit des metachromatischen Effektes Acridinorange 57 ($1 \mu\text{M}$ in 15 ml) bei pH 7 (---) und nach Zugabe von $7 \mu\text{M}$ der Sulfobernsteinsäurevesikel 24 (-.-.); die Temperatur beträgt 20°C ; die ausgezogene Kurve (—) gibt die Veränderung der Absorption bei Erhöhung der Temperatur auf 50°C wieder.

Aus der Veränderung der Spektren in Abb.56 kann man ableiten, daß es zu einer temperaturabhängigen Domänenbildung des Farbstoffs Acridinorange 57 an Sulfobernsteinsäuredicetylestervesikeln 24 kommt. Bei 20°C liegen in dem untersuchten System die Monomerenbande und die Dimerenbande in etwa gleichem Verhältnis vor. Bei einer Temperaturerhöhung auf 50°C wird die Dimerenbildung stark zurückgedrängt und es erscheint im wesentlichen die Monomerenbande des Farbstoffs, die stark ver-

breitert ist.

Titrationen der symmetrischen MLM-Membran aus dem Thioacetataddukt 30 bei pH 6 mit Methylblau 58 weisen im VIS-Spektrum bei einem Farbstoff-Vesikel-System (1:10) einen starken metachromatischen Effekt aus, mit einer nach 620 nm verschobenen Dimerenbande. Die Bande ist um etwa 20 nm zu kürzeren Wellenlängen verschoben. Dies ist in Abb.57 dargestellt.

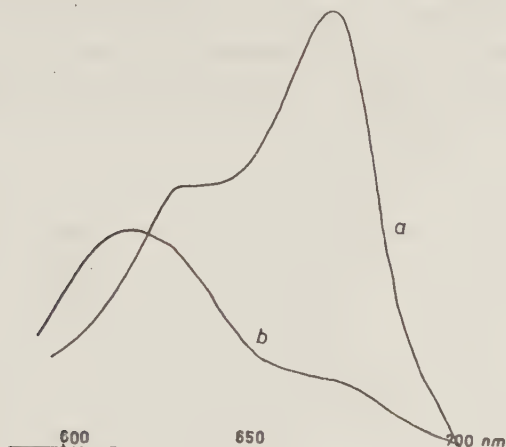


Abb.57: Titration einer Methylblaulösung 58 ($1 \mu\text{M}$ in 15 ml) mit $10 \mu\text{M}$ einer symmetrischen MLM-Vesikel aus dem Thioacetatdiaddukt 30 bei pH 6. a) ist das reine Farbstoffspektrum; b) zeigt das Spektrum nach Zugabe der Vesikellösung.

Eine weitere Untersuchung befaßte sich mit der Anwendung des metachromatischen Effektes auf die im Kapitel 5. beschriebenen Phosphorsäureamphiphile. Diese Untersuchung zeigte, daß sowohl der Phosphorsäuredihexadecylester 46 als auch das Bis-didodecandiyl-phosphorsäuretetron 48 bei leicht alkalischen pH-Werten (pH 8 -8,5) einen deutlichen metachromatischen Effekt ergeben, während die protonierten Verbindung bei pH 5 keinen metachromatischen Effekt mehr zeigen. Sowohl Untersuchungen mit Acridinorange 57 als auch mit Methylblau 58 führten zu den

gleichen Resultaten. Aus allen diesen Titrationen ergab es sich, daß bei den untersuchten Systemen höheraggregierte Systeme vorliegen müssen, denn der metachromatische Effekt wurde nur in der Wechselwirkung mit Polyanionen festgestellt. Die geladene Membranoberfläche ähnelt einem Polyanion und führt zu den gleichen Wechselwirkungen mit den Farbstoffen Acridinorange 57 und Methylenblau 58. Die Kombination elektronenmikroskopische Aufnahmen und Metachromasie an geladenen Membranoberflächen erlaubt es bei den Aggregaten von Vesikeln zu sprechen. Nach diesen beiden grundlegenden Methoden sollen die Vesikeln durch Einschlußexperimente weiter charakterisiert werden. Dies wird in den Kapiteln 6.3. und 6.4. beschrieben.

6.3 Einschlußversuche mit Magnesium-octaethylporphin (MgOEP)

Dieses Metalloporphyrin 59 wurde nach einer Variation des Verfahrens von Baum, Burnham und Plane 112 durch J.-H.Fuhrhop 113 gewonnen. Octaethylporphin (OEP) und MgOEP haben folgende Absorptionsbanden im sichtbaren Bereich des elektromagnetischen Spektrums:

	Soretbande, λ in nm (ϵ)	α -Bande, λ in nm (ϵ)
OEP	397 (169 000)	616 (4 700)
MgOEP	404 (490 000)	578 (18 000)

Ein vierbandiges Etio-Typ-Spektrum wird bei allen Porphyrinen gefunden, die sechs oder mehr periphere Positionen mit Seitenketten, wie z.B. -Ethylgruppen, besetzt haben 114. Im sauren Medium kann der Porphyrinring nach Protonierung der Stickstoffatome als Mono- oder Dikation vorliegen. Die Soretbande ist im Absorptionsspektrum der Dikationform zu größeren Wellenlängen verschoben, verglichen mit der neutralen Form. Das Dikationsspektrum zeigt zwei große Satellitenbanden; schwächere Banden, die als Schultern der Hauptbanden auftauchen, sind zu erkennen. Porphyrin-Monokationen haben eine Soretbande, die zu kürzeren Wellenlängen verschoben ist und drei Banden im sichtbaren Bereich. In DMSO/NaH entstehen Dianionen, deren Spektren denen der Dikationen ähneln. Metalloporphyrine haben eine Soretbande und im sichtbaren Bereich zwei kleinere Banden (α , β -Banden).

Als Beispiel für die regioselektive Einlagerung von Fremdmolekülen sind hier die Löslichkeitsversuche von MgOEP 59 in BLM-, symmetrische und unsymmetrische MLM-Vesikeln beschrieben. MgOEP ist nicht wasserlöslich. Sollte es gelingen, in Gegenwart eines Amphiphils, MgOEP in dem wäßrigen Medium zu lösen, wäre dies ein Anhaltspunkt für die Bildung von ausgedehnten hydrophoben Aggregaten. Das eingebaute MgOEP auch Rückschlüsse auf die Organisation der Aggregate. MgOEP wird durch Säure leicht entmetalliert und dieser Prozeß läßt sich über die deutliche Änderung der Elektronenspektren leicht verfolgen. Aus dem zweibandigen MgOEP-Spektrum entstehen entweder die kationischen Formen oder das vierbandige Spektrum des OEP.

MgOEP zeigt im Spektralbereich zwischen 600 und 500 nm zwei Banden in Petrolether bei $\lambda = 580$ nm und 543 nm.

Für die Einschlußversuche wurden Lipidfilme aus dem entsprechenden Amphiphil und MgOEP 59 hergestellt, die in wäßriger Lösung (pH 7) oder bei anderen pH-Werten beschallt wurden. Die Beschallung führte in allen Fällen zu einer vollständigen Auflösung des Porphinfarbstoffes. Die resultierenden Lösungen sind klar bis leicht trübe und haben eine rotviolette bis rotbraune Farbe. Die rotbraune Farbe deutet auf eine teilweise oder gänzliche Entmetallierung hin. Alle hergestellten Vesikellösungen können über Sephadex G 25-Säulen gereinigt werden. Die Lösungen laufen bei wäßriger Elution als scharfe Zonen auf der Säule. Von diesen Lösungen wurden Elektronenspektren aufgenommen. Als Referenz wurden Vesikellösungen ohne Farbstoff vermessen. Die Lösungen wurden auf ihre pH-Abhängigkeit und ihr Verhalten gegenüber einem Detergenz, wie z.B. Triton X 100, untersucht.

6.3.1. Einschluß von MgOEP 59 in die unsymmetrische MLM-Vesikellmembran

Die unsymmetrische MLM-Vesikellmembran aus dem Bernsteinsäure-tetrolidamphiphilen 38 ist dichter gepackt und schützt MgOEP 59 besser vor Entmetallierung als die symmetrischen monoschichtigen Membranen (siehe 6.3.2. und 6.3.3.). Bei pH=6 entspricht das Elektronenspektrum der gemischten Vesikellösung in Wasser dem Spektrum des MgOEP 59 in der Petroletherphase mit $\lambda = 580$ nm und 543 nm. Das MgOEP 59 ist vollständig in der hydrophoben Membran verankert. Bei der Titration mit verdünnter Salzsäure bleibt das eingeschlossene MgOEP 59 von der Entmetallierung verschont. Erst nach einer Stunde läßt sich die Bildung von OEP im Elektronenspektrum nachweisen, mittels der α -Bande bei $\lambda = 625$ nm. Die Bande ist damit 9 nm gegenüber dem Elektronenspektrum von OEP in Methanol verschoben. Die Zugabe des Detergenz Triton X 100 zur MgOEP/Vesikellösung bei pH 2 führte im Gegensatz zu den doppelschichtigen Vesikeln nicht sofort zur Zerstörung der Membran. Die Auflösung der Membran und die damit verbundene Entmetallierung des MgOEP 59 sind ein zeitabhängiger Prozeß. Erst nach drei Stunden ist OEP entstanden (vierbandiges Spektrum). Dieses Verhalten ist in der Abb.58 anhand der Elektronenspektren dokumentiert.

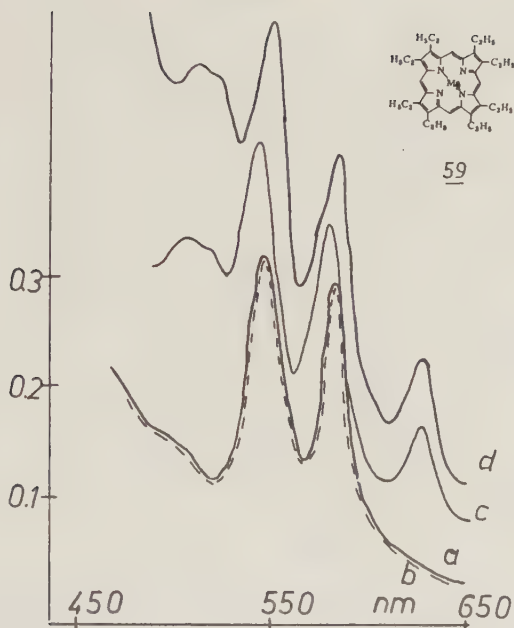


Abb.58:Elektronenspektren des MgOEP 59, daß in Vesikeln aus dem unsymmetrischen Bolaamphiphil 38 eingeschlossen ist. a) Elektronenspektrum bei pH 6; b) Spektrum nach dem Ansäuern mit 0,1 N HCl-Lösung auf pH 2; c) Elektronenspektrum (pH 2) 30 Minuten nach der Zugabe von Triton X 100 -Lösung; d) wie c) nach 90 Minuten.

Eine Erklärung für das relativ langsame Zerstören der MLM-Vesikelmembranen durch das Detergenz Triton X 100 wäre, daß das Detergenz und die monoschichtigen Vesikelbildner relativ stabile gemischte Mizellen bilden, die das MgOEP 59 eingeschlossen haben. Eine weitere Bestätigung des Einschlußes von MgOEP 59 in die unsymmetrische Membran aus 38 ergab das Fluoreszenzspektrum der gemischten Vesikellösung. In der Abb.59 ist das Fluoreszenzspektrum wiedergegeben. Im Unterschied zum Fluoreszenzspektrum von MgOEP 59 in Methanol tauchte im Spektrum der gemischten Vesikellösung eine zusätzliche Bande bei $\lambda = 620$ nm auf.

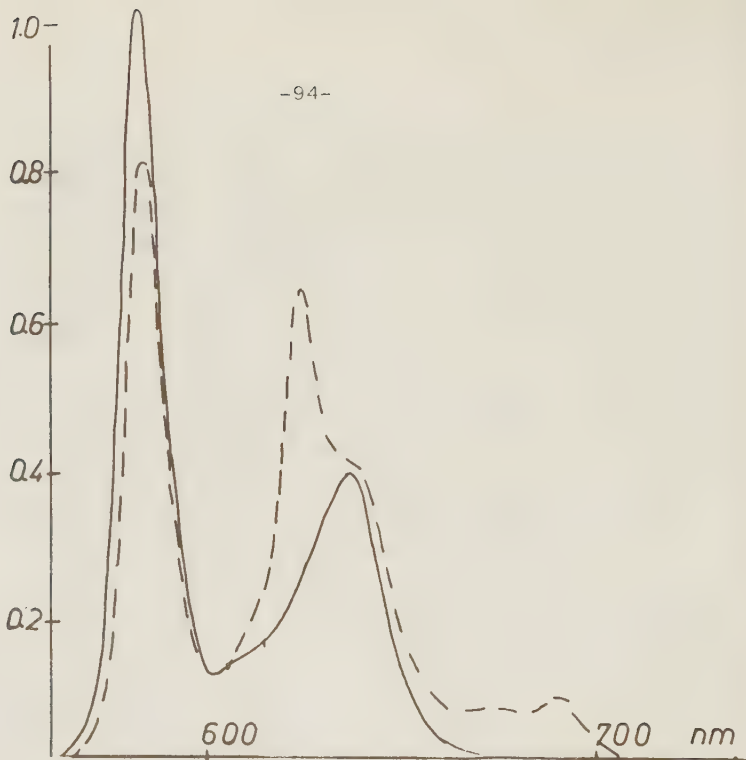


Abb.59: Fluoreszenzspektren von MgOEP 59 in Methanol (—) und in der unsymmetrischen MLM-Vesikel 38 (---).

6.3.2. Einschluß von MgOEP in eine symmetrische negativ geladene monoschichtige Vesikel

Bei pH 12 ergab sich beim Einschluß von MgOEP 59 in die symmetrische negativ geladene monoschichtige Vesikelmembran aus dem Thioacetat-Diaddukt 30 ein Etio-Typ-Spektrum (vierbandig) mit $\lambda = 626, 571, 543$ und 505 nm. Beim Ansäuern auf pH 6 verschob sich das Spektrum nur wenig, auf $\lambda = 624, 575, 542$ und 502 nm. Nach dem Verdünnen um den Faktor 4, wegen der schlechteren Löslichkeit der protonierten Form, und weiterem Ansäuern lag bei pH 2 die Monokationform des MgOEP 59 mit $\lambda = 599, 556$ und 528 nm vor. Nach der Triton X 100 -Zugabe veränderte sich das Spektrum innerhalb einer Stunde wieder zum vierbandigen Spektrum. In der Abb.60 ist das Monokationspektrum wiedergegeben.

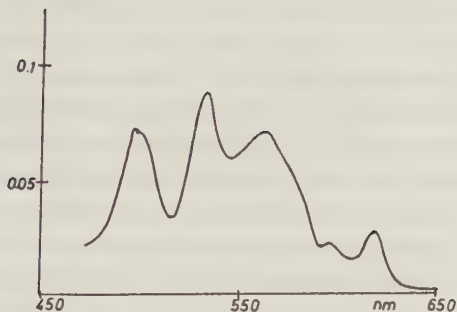


Abb.60: Monokationspektrum des MgOEP 59 in der symmetrischen monoschichtigen Vesikel aus dem Thioacetat-Diaddukt 30 bei pH 2.

Die symmetrische Vesikel ist also nicht so dicht gepackt wie die unsymmetrische Vesikel aus 38 (siehe 6.3.1.). Die symmetrische Vesikel aus dem Thioacetataddukt 30 hat, wie im Kapitel 6.1. beschriebenen eine sehr viel größere Oberfläche als die Mikrovesikeln der unsymmetrischen Bernsteinsäurevesikel 38. Der Angriff der Säure auf das MgOEP scheint ungehinderter zu sein.

6.3.3. Einschluß von MgOEP in eine neutrale MLM-Vesikel

Die Elektronenspektren des Einschlußes von MgOEP 59 in die neutrale monoschichtige Vesikel aus dem Dioladdukt 34 unterschieden sich von den Spektren des Einschlußes von MgOEP 59 in Vesikeln aus dem unsymmetrischen Bolaamphiphil 38. Bei pH 5 lag das Monokationspektrum vor, mit $\lambda = 562, 535$ und 498 nm. Säuert man weiter auf pH 3 an, so nimmt das Spektrum die Dikationform an, mit $\lambda = 590, 564$ und 551 nm. Beim Ansäuern flockte ein Niederschlag aus der Vesikellösung aus. Man muß die Vesikellösung um den Faktor 10 verdünnen, um eine Ausflockung zu ver-

meiden. Löst man den ausgeflockten Niederschlag in Methanol so zeigte sich, daß das MgOEP 59 mit der Membran ausfällt, denn das Elektronenspektrum zeigte intaktes MgOEP an. Die Zugabe von Triton X 100 veränderte das Spektrum zeitabhängig. Nach zwei Stunden lag das vierbandige Spektrum des OEP vor.

6.3.4. Einschluß von MgOEP in ein Phosphorsäuretetrolid
Der Einschluß von MgOEP 59 in die Phosphorsäuretetrolidvesikel aus 48 führte bei pH 6 zur Bildung der Monokationform. Bei dem weiteren Ansäuern fiel die Vesikel aus. Im alkalischen (pH 8) Milieu tauchte nur das vierbandige Spektrum des OEP auf. Auch die symmetrische Phosphorsäure-MLM-Vesikelmembran ist nicht so dicht gepackt wie die unsymmetrische Bernsteinsäuretetrolid-Vesikelmembran aus 38. Das MgOEP wurde entmetalliert.

6.3.5. Einschluß von MgOEP in doppelschichtige Vesikelmembranen
Der Einschluß von MgOEP 59 in die doppelschichtigen Vesikelmembranen aus dem Sulfobernsteinsäuredicetylerster 24 bzw. dem Phosphorsäuredicetylerster 46 wurde in dem pH-Bereich 12-2 untersucht. Bei allen pH-Werten ergab sich ein vierbandiges Spektrum mit $\lambda = 628 \text{ nm}$, 573 nm , 544 nm und 516 nm . Bei pH 2 war die 516 nm -Bande zu 508 nm verschoben. Die doppelschichtigen Vesikelmembranen sind noch durchlässiger als die monoschichtig-symmetrischen Vesikelmembranen. Das MgOEP wird nicht vor der Entmetallierung geschützt. Die OEP/Sulfobernsteinsäurevesikel-

24 und die OEP/Phosphorsäuredihexadecylestervesikel-Lösungen sind sehr stabil. Auch nach mehreren Wochen flokktten die Lösungen nicht aus. Die freiwerdenden Mg^{2+} -Ionen scheinen die Vesikeln zu stabilisieren.

6.4. Chemische Nachweise für die Vesikelbildung durch Einschluß von redox-abhängigen Verbindungen

6.4.1. Vesikelnachweis mit Methylenblau

Methylenblau 58 ist ein Thiazinfarbstoff, dessen Kation zwei Absorptionsbanden bei $\lambda = 672 \text{ nm}$ und 632 nm besitzt. Durch Reduktionsmittel, z.B. Natriumdithionit geht es in das farblose Leukomethylenblau über. Beschallt man nun eine Lösung (pH 2) des Farbstoffes 58 (10^{-2} M) und der unsymmetrischen Bernsteinsäuretetrolid-Vesikel 38 (10^{-3} M) zusammen, und entfernt den extravesikulären Farbstoff 58 auf einer Amberlite-Kationen austauschersäule, so zeigte der eingeschlossene Farbstoff 58 einen starken metachromatischen Effekt. Dies ist ein weiterer Beweis für die Orientierung der Kopfgruppen bei dem unsymmetrischen Bolaamphiphil 38. Zerstörte man die Membran durch den Zusatz von dem Detergenz Triton X 100 nach der Zugabe von Natriumdithionit so bildete sich die Leukoverbindung. Ohne Detergenz vermag das Dithionit den Farbstoff 58 nicht zu reduzieren.

6.4.2. Vesikelnachweis durch Reduktion von eingeschlossenen Paraquat-Amphiphilen

Amphiphile mit Paraquat-Kopfgruppen 6 können durch Reduktion mit Natriumdithionit in violette Viologenradikale umgewandelt werden. Dieses Verhalten kann man sich bei Testreaktionen zum Nachweis der Vesikelbildung zunutze machen. Das Tetrachlorid 1a (siehe Seite 2) ist gut wasserlöslich und kann als Redoxindikator verwendet werden. Beschallt man die zu untersuchenden Amphiphile mit wenigen Gewichtsprozenten von 1a, so wird 1a quantitativ in der Vesikel gelöst. Ein Zusatz von Dithionitlösung zu der gemischten Vesikellösung führte zur teilweisen Reduktion zu Viologenradikalen, da nur die äußeren Paraquat-Kopfgruppen einer Reduktion zugänglich sind. Durch Zusatz von dem Detergenz Triton X 100 wurde die Membran zerstört und 100% Reduktion waren zu beobachten. Diese Reduktionen sind für die symmetrischen Thiodiol-MLM-Vesikeln aus 34, für die Thioacetat-Vesikeln aus 30 und für die unsymmetrischen Bernsteinsäure-Vesikeln aus 38 in der Abb.61 enthalten.

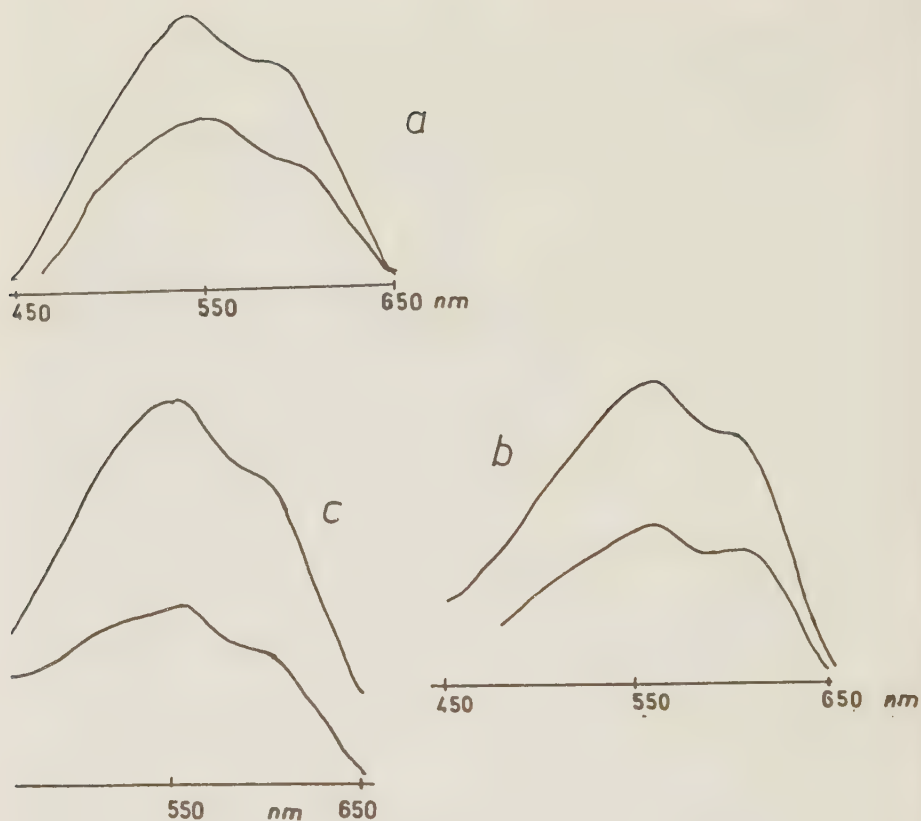


Abb.61: Einschlußversuche von dem Paraquat-Amphiphilen 1a in monoschichtige Vesikelmembranen, anschließende Reduktion mit Natriumdithionit und Zerstörung der Membran durch Zugabe von Triton X 100.

a) in das unsymmetrische Bolaamphiphil 38;

b) in die symmetrische Thioacetat-Vesikel 30;

c) in die symmetrische neutrale Thiodiol-Vesikel 34.

6.5. ^1H -NMR-Spektroskopie von Vesikellösungen

H.H.David ^{115a} hat mit TDA-Messungen die Phasenübergangstemperatur für vesikuläre Lösungen des Sulfobernsteinsäureditetradecylesters zu 47°C bestimmt. U.Wanja ^{115a} hat TDA-Messungen an vesikulären Lösungen des Bolaamphiphils ³⁸ durchgeführt. Die Membran zeigte keinen Schmelzpunkt im Bereich 20 bis 60°C .

Die ^1H -NMR-Spektren von synthetischen doppelschichtigen Vesikelbildnern zeigen ein ähnliches Verhalten wie es in den Spektren der Vesikellösungen von Phospholipiden auftritt. Die NMR-Signale sind auch hier infolge der eingeschränkten molekularen Bewegung unterhalb der Phasenübergangstemperatur stark verbreitert ¹¹⁵. Aus Untersuchungen an Phospholipiden sind folgende NMR-Meßmethoden bekannt:

1. Das Verhältnis der Kopfgruppen außen zu den Köpfen innen wird über die chemische Verschiebung mittels Verschiebungsreagenzien abgeleitet. Kostelnik und Castellano ¹¹⁶ zeigten, daß die Protonenresonanzsignale für die Trimethylammoniumgruppe von beschallten Dispersionen von Eilecithin in D_2O aus zwei Paks bestehen. Die Intensitäten verhalten sich wie $1,85:1$ und die Signale sind 5 Hz gegeneinander verschoben. Als Verschiebungsreagenz wurde MnSO_4 benutzt.

2. Andrews et al. ¹¹⁷ untersuchten den Einfluß von Lanthanidenionen als Verschiebungsreagentien für Phospholipidvesikeln. Berden et al. ¹¹⁸ fanden, daß für Phospholipidmischungen, die negative Lipide enthalten, $\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-}$ -Ionen ein sehr brauchbares Verschiebungsreagenz zur Messung des Verhältnisses innen/außen ist. In Abhängigkeit von der Präparation verschieben sich entweder nur die äußeren, nur die inneren oder auch beide Protonen.

Dem Zusammenspiel der Komponenten in der Membranstruktur liegen sterische Restriktionen zugrunde, was sich in einem charakteristischen Abbild der molekularen Bewegung ausdrückt. Beschallte Dipalmitoyllecithin-Vesikeln geben über 40°C hochaufgelöste ^1H -NMR-Signale ¹¹⁹, in denen die quarternäre Trimethylammoniumkopfgruppe, die Oligomethylenkettenprotonen und die Methylgruppen gut definierte Resonanzfrequenzen sind. Wenn die Temperatur unter 40°C fällt, bricht das Spektrum zusammen.

Eigene Untersuchungen an Vesikellösungen des Thiodioladduktes ²⁷ (siehe Kapitel 3.) bestätigen, daß sich auch synthetische neutrale Amphiphile wie die zwitterionischen Lecithine verhalten. In der Abb. 62 sind die temperaturabhängigen ^1H -NMR-

Spektren des Thiodioladduktes 27 in D_2O wiedergegeben.

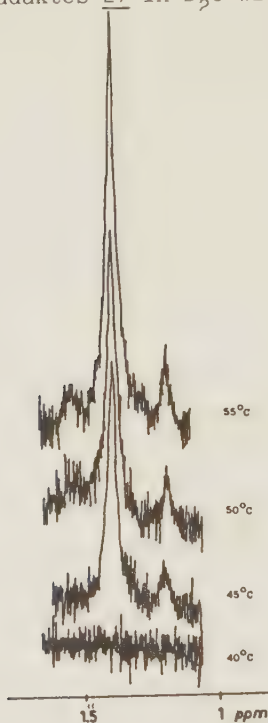


Abb.62: Temperaturabhängige 1H -NMR-Spektren von beschallten Lösungen des doppelschichtigen Thiodioladduktes 27 in D_2O .

Im Bereich zwischen 40 und 45°C liegt die Phasenübergangstemperatur für Vesikellösungen des Thiodioladduktes 27. Unterhalb dieser Temperatur sind keine NMR-Signale im Spektrum zu erkennen. Die Temperaturerhöhung auf 55°C führte zu keiner wesentlichen Verschärfung der Piks für die Oligomethylenprotonen. NMR-Versuche mit dem Sulfobernsteinsäuredicetyylester 24 zeigten, daß auch dort bei 50°C nur die Signale für die Oligomethylenprotonen zu erkennen sind. Die Kopfgruppenprotonen tauchten in den temperaturabhängigen NMR-Spektren der doppelschichtigen Vesikelmembranen nicht auf.

Vorversuche für Verschiebungsexperimente zeigten, daß die Vesikeln bei Zugabe von Lanthanidenionen ausfallen. Daher wurden diese Experimente nicht weiter verfolgt.

Ganz anders verhalten sich dagegen die beschallten Lösungen von monoschichtigen Bernsteinsäuretetrolidamphiphilen. Normalerweise sollte man annehmen, daß die molekulare Bewegung in den MLM-Vesikelmembranen noch weiter eingeschränkt sein sollte als bei den doppelschichtigen Vesikelmembranen.

Die Untersuchungen an Vesikellösungen des Thioacetat-Diadduktes 30 in D_2O zeigten folgende Ergebnisse. Bei Raumtemperatur erschienen die NMR-Signale für die Oligomethylenkettenprotonen bei $\delta = 1,3$ ppm relativ scharf und eine Temperaturerhöhung auf $90^\circ C$ führte zu keiner nennenswerten Verringerung der ohnehin schon recht scharfen Halbwertsbreiten der Methylensignale. Die Kopfgruppenprotonen sind ebenfalls zu erkennen. Das Beschallen in D_2O führte zu einem Austausch von etwa 50%, der am α -ständigen C-Atom liegenden Protonen. Dieser H-D-Austausch ist über die Integration der NMR-Signale zu ersehen.

Der Versuch einen vollständigen H-D-Austausch in $D_2O/NaOD$ scheiterte, da die Löslichkeit im alkalischen Medium schlechter war und im temperaturabhängigen NMR-Spektrum nur noch die Oligomethylenprotonen zu erkennen waren.

Eine NMR-Untersuchung an dem unsymmetrischen Bernsteinsäuretetrolid 38 ergab, daß die NMR-Signale für die Oligomethylenprotonen bei $\delta = 1,3$ ppm bei Raumtemperatur schon relativ scharf waren, und eine Temperaturerhöhung auf $70^\circ C$ zu keiner bedeutenden Verschärfung der Signale führte. Die Kopfgruppenprotonen sind in den unsymmetrischen Vesikellösungen aus 38 sehr schlecht zu erkennen. Die Bewegung ist gegenüber den symmetrischen monoschichtigen Amphiphilen weiter eingeschränkt, aber nicht so stark wie in den doppelschichtigen Vesikelmembranen.

Eine Untersuchung an dem Sulfo-Diaddukt 29 zeigte, daß die symmetrische Sulfovesikel bei $50^\circ C$ im NMR-Spektrum auch nur die Oligomethylenprotonen bei $\delta = 1,3$ ppm aufweist.

Ein H-D-Austauschexperiment in $D_2O/NaOD$ an dem α -ständigem (zur Sulfogruppe) C-Atom scheiterte daher. Die Kopfgruppenprotonen waren nicht zu sehen.

In der Abb. 63 sind die temperaturabhängigen ^1H -NMR-Spektren der Thioacetat-MLM-Vesikelmembran 30 und der unsymmetrischen Bernsteinsäuretetrolid-Vesikelmembran 38 in D_2O zusammengefasst.

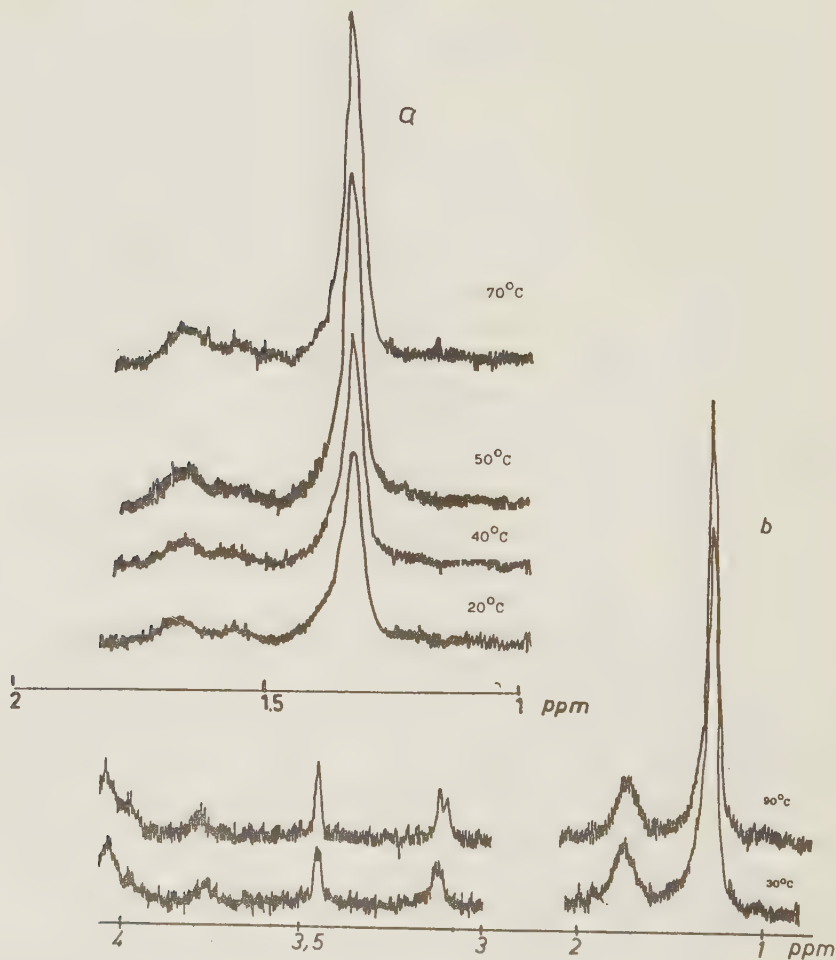


Abb.63: Temperaturabhängige ^1H -NMR-Spektren von monoschichtigen Vesikellösungen; a) unsymmetrische Bernsteinsäurevesikel b) symmetrische Thioacetat-Diaddukt-Vesikel.

6.6 Stabilität von Vesikellösungen

Doppelschichtige Vesikel sind nicht langzeitstabil. Bei BLM-Vesikeln kommt es im Laufe der Zeit zur Fusion ¹²⁰ und die Vesikeln präzipitieren innerhalb weniger Stunden oder Tage.

Die im Rahmen dieser Arbeit hergestellten Vesikellösungen aus den doppelschichtbildenden Amphiphilen 24 (Sulfobernsteinsäuredicetyler) und 25 (Thiobernsteinsäurebernsteinsäuredicetyler) sind einige Tage stabil bevor sie ausfallen. Bei Vesikellösungen aus dem Thiodioladdukt 27 fallen schon nach wenigen Stunden Aggregate aus. Flockulierte BLM-Vesikellösungen müssen erneut beschallt werden, um die Lösung zu homogenisieren. Anders verhalten sich dagegen die monoschichtigen Vesikeln. Besonders die Vesikeln aus dem unsymmetrischen Bernsteinsäure-tetrolid 38 sind längere Zeit stabil. Erst nach etwa zwei Wochen ist eine leichte Niederschlagsbildung zu erkennen. Diese Lösungen können durch einfaches Erwärmen wieder geklärt werden. Eine elektronenmikroskopische Untersuchung der erneut homogenisierten Lösungen zeigte sphärische Vesikeln mit den gleichen Durchmessern wie die ursprünglichen Vesikeln.

Die im Rahmen dieser Arbeit gewonnenen Amphiphile enthalten Esterbindungen. Ester können sauer oder alkalisch verseift werden. Es sollte überprüft werden, ob die Esterbindungen in den Vesikeln gegen Hydrolyse stabil sind.

Der chemische Angriff müßte in der Region 4 bzw. 6 (siehe Seite 80) der Vesikeln erfolgen. Die Untersuchung erstreckte sich auf die BLM-Vesikeln aus dem Sulfobernsteinsäuredicetyler 24 bzw. dem Phosphorsäuredicetyler 46, die symmetrischen MLM-Vesikeln aus dem Thioacetat-Diaddukt 30 bzw. dem Phosphorsäuretetrolid 48 und die unsymmetrische MLM-Vesikel aus dem Bernsteinsäure-tetrolid 38. Die Vesikeln wurden in 1 N HCl- bzw. 1 N NaOH-Lösung beschallt und anschließend bei 70°C für 48 Stunden inkubiert. In regelmäßigen Zeitabständen wurden Proben entnommen und auf die Bildung von 1-Hexadecanol bzw. 1,12-Dodecandiol untersucht. Als Nachweismethoden dienten Dünnschicht- und Gaschromatographie. Es zeigte sich, daß alle Vesikellösungen unter diesen Bedingungen gegen saure und alkalische Hydrolyse beständig sind. Lediglich bei den Vesikeln aus dem Phosphorsäuredicetyl-

ester 46 in saurer Lösung konnte die Bildung von wenig 1-Hexadecanol nachgewiesen werden. Die Region 4 bzw. 6 der Vesikel ist also chemisch schlecht zugänglich.

Ein korrespondierendes Experiment, nämlich die Synthese des Maleinsäuremakrotetrolides 10 aus den Vorstufen in vesikulärer Lösung, bestätigte diese Resultate. Dazu wurden die Makrocyclusvorstufe 11 und 1,12-Dodecandiol mit dem unsymmetrischen Bolaamphiphil 38 zusammen in 1 N HCl-Lösung beschallt, auf 70°C inkubiert und anschließend in regelmäßigen Zeitabständen auf die Bildung des Maleinsäuremakrocyclus 10 untersucht. In keiner der Proben konnte dieser Makrocyclus 10 nachgewiesen werden. Diese Ergebnisse stehen in Einklang mit Resultaten von H.Bartsch, D.Fritsch und J.-H.Fuhrhop 121 und T.Kunitake et al. 122, die alle an verschiedenen Amphiphilen diese Hydrolysebeständigkeit auch festgestellt hatten, wenn diese in vesikulärer Lösung vorlagen.

6.7. Schichtdicke der Membranen

Die Schichtdicke der Membran kann mit mehreren Methoden ermittelt werden:

1. Aufnahme der asymmetrischen Strom-Spannungskurven und Ermittlung der spezifischen Kapazitäten an schwarzen Lipidmembranen 4 (siehe dazu Kapitel 2.3., Seite 25 und Seite 33).
2. Röntgenbeugungsdiagramme von Vesikellösungen 123
3. Elektronenmikroskopie 124
4. Ionenporen 125

Aus den Röntgenbeugungsdiagrammen am Feststoff des unsymmetrischen Bolaamphiphils 38 ergab sich, eine Schichtdicke von 28 Å. Daraus folgt, daß das Bolaamphiphil 38 in der all-trans-Konformation vorliegt. Die Anwendung der Röntgenbeugung auf Vesikellösungen konnte leider aus apparativen Gründen zunächst nicht durchgeführt werden.

Ein indirekter Beweis der geringen Schichtdicke der hydrophoben Membran (24 Å) gelang J.-H.Fuhrhop und U.Liman 125 die zeigten, daß das α, ω -dianionische Monensinderivat 60 Lithiumkanäle in Vesikeln aus dem Thioacetat-Diaddukt 30 erzeugt. In doppelschichtigen Membranen können mit dem Monensinderivat 60 keine

Lithiumkanäle erzeugt werden. In der Abb. 64 ist ein Modell für die Lithiumionenfreisetzung aus monoschichtigen Vesikelmembranen, z.B. der Thioacetat-Diaddukt-Membran 30 dargestellt.

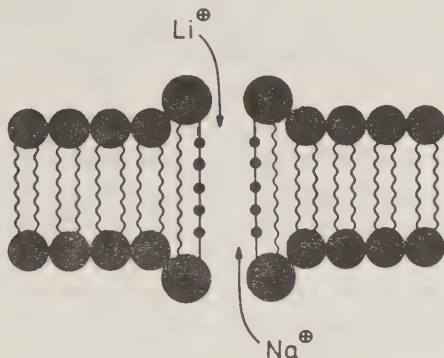
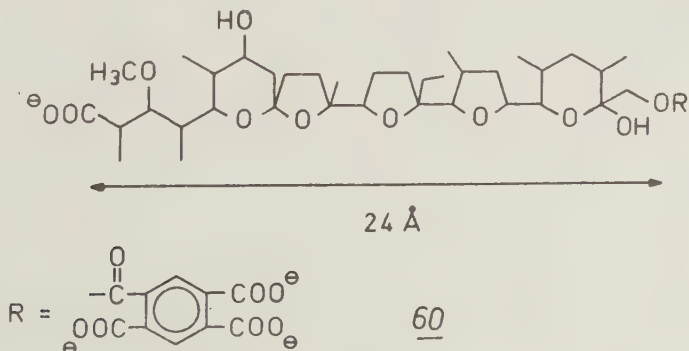


Abb. 64: Modell für die Lithiumfreisetzung aus monoschichtigen Vesikelmembranen mit dem Monensinderivat 60 (mit Genehmigung des Autors entnommen).

Aus den bisher vorliegenden Ergebnissen (Metachromasie, siehe Kapitel 6.2.; der Ionenpore 125 und dem Beugungsdiagramm am Feststoff) kann man mit einiger Sicherheit ableiten, daß die Bernsteinsäuretetrolide in Vesikellösungen monoschichtig vorliegen.



6.8. Diskussion

Bolaamphiphile mit makrocyclischen Estern als hydrophobem Gerüst sind geeignete Vesikelbildner zur Ausbildung monoschichtiger Membranen. Welche Unterschiede bestehen nun zwischen den doppelschichtigen Vesikelmembranen und den Membranen aus den Bernsteinsäuretetroliden und den Phosphorsäuretetroliden? Die doppelschichtigen Vesikeln haben eine Größe von durchschnittlich 500 - 1000 Å. Bei den monoschichtigen unsymmetrischen Bernsteinsäuretetroliden und den Phosphorsäuretetroliden kommt es zur Ausbildung von Mikrovesikeln mit etwa 200 - 300 Å. Die symmetrischen monoschichtigen Vesikeln sind in der Regel sehr groß; Durchmesser zwischen 1000 und 3000 Å treten bevorzugt auf. Eine Erklärung für diese Unterschiede in der Vesikelgröße ergibt aus der unterschiedlichen Krümmung in unsymmetrischen und symmetrischen Bernsteinsäuretetrolidvesikeln. Die unsymmetrische Bernsteinsäuretetrolidvesikel besitzt eine hohe Krümmung, da das Vesikelmonomere eine Keilform aufweist wegen der unterschiedlich großen Kopfgruppen. Bei den symmetrischen Bernsteinsäuretetrolidvesikeln kommt eine gewisse Krümmung der Vesikelbausteine durch die unterschiedlichen Ausdehnungen der inneren und äußeren Kopfgruppen zustande.

Die Vesikeln mit Carboxylatkopfgruppen können durch Ansäuern in ihrer Struktur verändert werden. Die protonierten COOH-Kopfgruppen neigen zu einer vermehrten Aggregation und es bilden sich traubenförmige oder kettenförmige Strukturen aus. Die Ursache für diese Aggregation der Vesikeln liegt in den starken Wasserstoffbrückenbindungen, die sich ausbilden können.

Die Vesikeln können auch durch Zusätze in ihrem Aufbau verändert werden. Man muß dabei zwischen "spacern" unterscheiden, die sich in die hydrophobe Membran einlagern und solchen, die sich zwischen die Kopfgruppen schieben. Der unpolare Farbstoff MgOEP 59 lagert sich in die hydrophobe Membran (Region 5) ein und führt zu einer weiteren Erniedrigung der Krümmung. Die Vesikeln mit eingeschlossenem MgOEP 59 sind größer als Vesikeln ohne diesen Zusatz. Der Einschub von "spacern" zwischen die Kopfgruppen hebt die Krümmung auf und es bilden sich langgestreckte Stab- oder Röhrenstrukturen aus. Eine einfache Komplexierung dagegen stabilisiert z.B die Phosphorsäuretetrolid-

vesikel 48.

Die Dicke der monoschichtigen Membran ist etwa auf die Hälfte der doppelschichtigen Vesikelmembranen verringert worden. Beweise für die Monoschichtigkeit der Bernsteinsäuretetrolid-vesikel ergeben sich aus den metachromatischen Titrations-, dem Einbau der Ionenpore Monensin-26-pyromellitat 60 125 sowie aus dem Röntgenbeugungsdiagramm am Feststoff der Verbindung 38. Monoschichtige Vesikelmembranen sind stabiler als ELM-Membranen. Nach den bisher vorliegenden Befunden fusionieren sie nicht. Sie sind auch gegen organische Lösungsmittel und Detergentien stabiler als die doppelschichtigen Membranen. In ihrer Stabilität gegenüber hydrolytischem Angriff unterscheiden sich doppelschichtige und monoschichtige Membranen mit Esterbindungen nicht. Dies belegt, daß die Regionen 4 bzw. 6 der Vesikel für chemische Umsetzungen schlecht zugänglich sind.

Während die doppelschichtigen Vesikelmembranen sehr oft eine Phasenübergangstemperatur um 40°C besitzen, scheinen die monoschichtigen Vesikelmembranen in dem Temperaturbereich zwischen 20 und 90°C keinen oder einen sehr stark abgeschwächten Phasenübergang zu besitzen. Die NMR-Untersuchungen an Vesikellösungen bestätigen diese Hypothese.

Aus den NMR-Untersuchungen lassen sich auch Rückschlüsse auf die Beweglichkeit der Bausteine in den Vesikeln ziehen. In der symmetrischen monoschichtigen Thioacetat-Diaddukt-Vesikelmembran 39 sind sogar die Protonen der Kopfgruppen klar im Spektrum zu sehen. Die unsymmetrische Vesikel 32 verhält sich dagegen wie die doppelschichtige Vesikelmembranen in bezug auf die Kopfgruppen. Sie sind relativ starr. Die Kettenprotonen weisen dagegen eine höhere Beweglichkeit als in ELM-Membranen auf.

Aus den Einschlussexperimenten mit MgOEP 59 ergab sich, daß die monoschichtigen Vesikelmembranen dichter gepackt sind als die Doppelschichtmembranen. Besonders stabil und dicht gepackt ist die gemischte MgOEP/unsymmetrisches Bernsteinsäuretetrolid 38 - Vesikel.

Zur Zeit kann ein fertiges Modell für die MLM-Vesikeln nicht gegeben werden. Aus den experimentellen Befunden kann aber eine Modellvorstellung abgeleitet werden. Die Struktur einer MLM-

Vesikel wird determiniert durch die hydrophilen Kopfgruppen. Die dichte Packung der hydratisierten inneren Köpfe bestimmt die Größe der Vesikel. Durch die relative Starrheit des makrocyclischen hydrophoben Gerüsts entstehen Lücken an der äußeren Oberfläche der MLM-Vesikel. Bei symmetrischen monoschichtigen Vesikelmembranen ohne Zusätze besetzen die äußeren Kopfgruppen eine größere Fläche als die inneren Köpfe. MLM-Vesikel sind selbst dann "unsymmetrisch", wenn beide Kopfgruppen identisch sind. Innen ist weniger Platz für Kopfgruppen und hydrophoben Teil als außen. In Anlehnung an das Modell für die BLM-Vesikelmembranen können die Lücken auch durch Zusatzstoffe, sogenannte "spacer", geschlossen werden. Diese Zusätze können die hydrophobe Membran und die Kopfgruppen gleichermaßen stabilisieren. Krümmung kann bei den -COO^- -Gruppen enthaltenden Amphiphilen durch "einseitige Ausfällung" der inneren Kopfgruppen (siehe Abb. 65) oder durch Komplexierung der äußeren Köpfe erzeugt werden, oder durch den Einbau von "spacern" in die Regionen 3/4 vernichtet werden. Aus der Abb. 65 geht hervor, daß beim vorsichtigen Ansäuern (etwa pH 5-5,5) die -COO^- -Gruppen teilweise protoniert werden und in die freien schwerer löslichen Carbonsäuren übergehen. Diese "einseitige Ausfällung" ist vergleichbar mit der partiellen Bildung von unlöslichen Salzen bei den Paraquat-amphiphilen 1b ⁶.

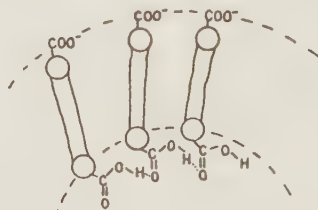


Abb. 65: "Einseitige Ausfällung" bei carboxylathaltigen Amphiphilen erzeugt die zur Vesikelbildung notwendige Krümmung.

Die Länge des hydrophoben Gerüsts kann nicht beliebig variiert werden. Analog zu Untersuchungen von T. Kunitake et al. ¹²⁶ gelten auch für die makrocyclischen monoschichtigen Vesikelbildner gewisse Rahmenbedingungen. Eine Kettenlänge von zehn C-Atomen führt zu recht gut wasserlöslichen Verbindungen. Diese kann für die Carboxylate durch Titration mit Säure teilweise aufgehoben werden.

6.9. Zusammenfassung

Durch Veresterung von langkettigen α,ω -Diolen mit Maleinsäureanhydrid bzw. POCl_3 wurden Maleinsäuretetrolide und Phosphorsäuretetrolide hergestellt. Zum Vergleich wurden die entsprechenden Dialkylester durch Veresterung von MSA bzw. POCl_3 und 1-Hexadecanol hergestellt.

Der Maleinsäuredihexadecylester und die Maleinsäuretetrolide mit 10, 12 und 16 C-Atomen wurden durch Michael-Addition schwefelhaltiger Nucleophile zu den entsprechenden Bernstein-säureamphiphilen derivatisiert.

Eine photochemische und thermische Isomerisierung des Z,Z-Bis-maleinsäure-didodecandiyl-tetrons wurde untersucht.

Die Bernsteinsäure- und die Phosphorsäureamphiphile bilden durch Ultraschall Vesikelmembranen. Die Vesikelbildung wurde mit umfangreichen elektronenmikroskopischen Untersuchungen, metachromatischen Titrations, Einschluß von MgOEP, chemische Nachweise mit redoxabhängigen Verbindungen und ^1H -NMR-Untersuchungen an Vesikellösungen nachgewiesen.

Eine vollständig unsymmetrische monoschichtige Verbindung konnte durch schrittweise Addition von Schwefelnucleophilen an das Bis-maleinsäure-didodecandiyl-tetron gewonnen werden. Die Orientierung der großen Köpfe außen und der kleinen Kopfgruppen innen, in der unsymmetrischen Vesikelmembran, konnte mit vergleichender Anwendung des metachromatischen Effekts nachgewiesen werden.

Eine vergleichende Betrachtung zwischen doppelschichtigen und monoschichtigen Vesikelmembranen wurde angestellt.

Eine Stabilitätsuntersuchung der Esterbindungen in vesikulärer Lösung ergab, daß die Regionen 4 und 6 der Vesikel für einen chemischen Angriff schlecht zugänglich sind.

"Nicht-Amphiphile", wie Phenolphthalein, Bromthymolblau, Carminsäure und Carminsäureoctaacetat, wurden bezüglich ihrer Fähigkeit Membranen zu bilden elektronenmikroskopisch untersucht. Die Durchlässigkeit der Carminsäureoctaacetat-Membran für Hydroxylionen ist gering.

7. EXPERIMENTELLER TEIL

Die Schmelzpunkte wurden mit einem Kofler Heiztischmikroskop der Fa. Reichert bzw. einem Apparat nach Tottoli der Fa. Büchi Modell 510, bestimmt und sind nicht korrigiert.

Zur Aufnahme der Elektronenspektren dienten die Geräte DMR 21 der Fa. Zeiss, Cary 17 D der Fa. Varian sowie die Modelle DK 2A und Acta M VI der Fa. Beckman. Es wurden 10 mm QS-Küvetten der Fa. Helma verwendet.

IR-Spektren wurden mit Perkin-Elmer-Geräten, Modelle 521 und 580 B als KBr-Presslinge gemessen.

Die Geräte HA 100 der Fa. Varian und WH 270 der Fa. Bruker dienten zur Anfertigung der ^1H -NMR-Spektren. Die δ -Werte beziehen sich auf TMS als inneren Standard.

Mit den Modellen MS 30 bzw. MS 9 der Fa. AEI bzw. CH5 DF und MAT 711 der Fa. Varian-MAT wurden die Massenspektren erhalten. Fluoreszenzmessungen wurden mit einem Perkin-Elmer-Spektrophotometer MPF 44 B in 10 mm QS-Küvetten der Fa. Helma durchgeführt. Bestrahlt wurde mit einer Hedler-Photolampe, die mit einer 300 W Photolampe G 176 der Fa. Osram bestückt war.

Die Oberflächenspannungen wurden mit einem Krüss Tensiometer nach Lecomte du Nouy gemessen.

Elementaranalysen fertigten die Fa. Robert Glier, Röthling bzw. das Mikrolabor des Instituts für Organische Chemie der FU Berlin an.

Für die Säulenchromatographie wurde Kieselgel 40 ohne Indikator der Fa. Merck verwendet. Die präparative Schichtchromatographie wurde mit 20 mal 20 cm Glasplatten ausgeführt, die mit 1 mm Kieselgel ohne Indikator beschichtet wurden (Fa. Woelm). Die Suspension wurde mit 12,5%iger Silbernitratlösung angerührt. Zur Herstellung der Vesikellösungen diente das Ultraschallgerät W 220 F (Fa. Heat Systems-Ultrasonics) mit Standard-Horn (1/2''). Das verwendete Elektronenmikroskop war ein Elmiskop 1139 (Fa. Siemens).

Die für die elektronenmikroskopischen Untersuchungen benutzten Objektträger waren Cu/Pd-Netze ($\emptyset = 3,05 \text{ mm}$) mit 400 Feldern (Fa. Polaron Equipment).

Zur Befilmung der Netze wurden folgende Materialien verwendet: Kollodium (Walsroder Collodiumwolle E 905) der Fa. Wolff & Co. Kohle (Spektralkohle höchster Reinheit) der Fa. Ringsdorff Werke. Für die Aufbringung der Kohleschicht wurde eine Kohleverdampfungsapparatur nach Bradley benutzt (Eigenbau des Fritz-Haber-Instituts, Berlin).

Zur Elektronenmikroskopie wurden die Lösungen negativ kontrastiert mit 1%iger Uranylacetatlösung; elektronenmikroskopische Vergrößerung: 40 000 : 1; Gesamtvergrößerung etwa 80 000 : 1;

Die gaschromatographischen Untersuchungen wurden mit dem Gerät Sigma/1 der Fa. Perkin-Elmer mit Flammenionisationsdetektor durchgeführt. Als Säulen wurden SE 30/19 und Silicongummi OV 17/6 verwendet. Die Säulentemperatur betrug 350°C. Als Trägergas wurden 25 ml He/min verwendet. Die Probenmenge war 1 µl.

7.1. Darstellung der hydrophoben Molekülgerüste

7.1.1. Darstellung der α, ω -Diole

7.1.1.1. Darstellung von 1,10-Decandiol 7 und 1,12-Dodecandiol 8

Die Darstellung der α, ω -Diole beruhte auf der Veresterung und anschließenden Reduktion der Dicarbonsäuren mit Natrium. Die Synthese wurde nach A.Manske ²⁸ durchgeführt und ergab die Diole 7 und 8 in 75%iger Ausbeute mit den Schmelzpunkten: 70°C für das 1,10-Decandiol 7 bzw. 80°C für das 1,12-Dodecandiol 8. Die so hergestellten Diole besaßen eine größere Reinheit als die käuflichen Produkte (Fa.Merck).

7.1.1.2. Darstellung von 1,16-Hexadecandiol 9

Die Darstellung beruhte auf der Reduktion der 1,16-Hexadecandicarbonsäure und wurde nach Organikum ²⁹ durchgeführt.

Ansatz: 2 g 1,16-Hexadecandicarbonsäure und 0,5 g LiAlH_4 in 200 ml THF;

Ausbeute: 1,25 g (70% d.Th.) mp. 92°C; $R_f = 0,62$ (Kieselgel, Dioxan, KMnO_4);

$\text{C}_{16}\text{H}_{34}\text{O}_2$ (258) ber. C 74,41 H 13,18
gef. C 74,67 H 12,90

7.1.2. Darstellung des Maleinsäuredihexadecylesters 16 ³¹

70 g (0,29 mol) 1-Hexadecanol wurden in einem 1l-Kolben in ca. 400 ml absolutem Benzol gelöst. Dazu gab man 16,5 g (0,143 mol) Maleinsäureanhydrid und 1 ml konz. Schwefelsäure. Die homogene Lösung wurde 8 Stunden unter Rückfluß und Wasserabscheidung gekocht. Danach wurde zur Trockene abdestilliert und das erhaltene weiße Rohprodukt aus ca. 1200 ml eines Aceton/Methanol-Gemisches (1:3 bis 1:1) zweimal umkristallisiert.

Ausbeute: 74,5 g (92% d.Th.) mp. 46-47°C; $R_f = 0,93$ (Kieselgel, Benzol/Dioxan/Eisessig 90:25:4);

IR-Spektrum: $\nu = 1732, 1721 \text{ cm}^{-1}$ (C=O, Ester), 1640 cm^{-1} (C=C);
 $^1\text{H-NMR-Spektrum}$ (270 MHz, CDCl_3): $\delta = 0,89$ (t, 6H, $-\text{CH}_3$), 1,26 (s, 52H, $-\text{CH}_2-$), 1,68 (m, 4H, $-\text{OCH}_2\text{CH}_2-$), 4,18 (t, 4H, $-\text{COOCH}_2-$), 6,24 ppm (s, 2H, $-\text{CH}=\text{CH}-$);

Massenspektrum: m/e: 564,9; M^+ 19%, 322 ($\text{M}-\text{C}_{16}\text{H}_{33}\text{OH}$)⁺ 100%

$\text{C}_{36}\text{H}_{68}\text{O}_4$ (564,9) ber. C 76,53 H 11,88
gef. C 76,50 H 11,60

7.1.3. Darstellung der Makrotetrolidvorstufen

7.1.3.1. Bis-2-butendicarbonsäure-decandiylester 14

9,81 g (0,1 mol) Maleinsäureanhydrid und 8,71 g (0,05 mol) 7 wurden in 300 ml absolutem Benzol 8 Stunden unter Rückfluß erhitzt. Beim Abkühlen fallen weiße Kristalle aus, die abgesaugt und aus 250 ml Methylethylketon umkristallisiert wurden.

Ausbeute: 10,1 g (55% d.Th.) mp. 112°C;

IR-Spektrum: ν = 3300-2500 cm^{-1} (COOH), 1730 cm^{-1} (C=O, Ester), 1650 cm^{-1} (C=C), 1430 cm^{-1} (COOH, Deformation);

$^1\text{H-NMR}$ -Spektrum (270 MHz, DMSO- d_6): δ = 1,3 (m, 12H, $-\text{CH}_2-$), 1,6 (m, 4H, $-\text{OCH}_2\text{CH}_2-$), 4,08 (t, 4H, $-\text{COOCH}_2-$), 6,36 ppm (d, 4H, $-\text{CH}=\text{}$);

Massenspektrum: m/e: 370 M^+ fehlt, 273 ($\text{M}-\text{C}_4\text{H}_2\text{O}_3$) $^+$ 60%;

$\text{C}_{18}\text{H}_{26}\text{O}_8$ (370,3) ber. C 58,37 H 7,07

gef. C 58,96 H 7,37

7.1.3.2. Bis-2-butendicarbonsäure-dodecandiylester 11

Vorschrift analog zu 7.1.3.1.; Ausbeute: 18,9 g (95% d.Th.);

mp. 117-119°C; R_f = 0,55 (Kieselgel, Benzol/Dioxan/Eisessig 90:25:4)

IR-Spektrum: ν = 3300-2500 cm^{-1} (COOH), 1725 cm^{-1} (C=O, Ester), 1648 cm^{-1} (C=C), 1425 cm^{-1} (COOH);

$^1\text{H-NMR}$ -Spektrum (270 MHz, DMSO- d_6): δ = 1,3 (m, 16H, $-\text{CH}_2-$), 1,7 (m, 4H, $-\text{OCH}_2\text{CH}_2-$), 4,27 (t, 4H, $-\text{COOCH}_2-$), 6,40 (d, 4H, $-\text{CH}=\text{}$), 10,5 ppm (s, 2H, $-\text{COOH}$);

Massenspektrum: m/e: 398 M^+ fehlt, 355 ($\text{M}-\text{CO}_2$) $^+$ 3%, 301 ($\text{M}-\text{C}_4\text{H}_2\text{O}_3$) $^+$ 10%;

$\text{C}_{20}\text{H}_{30}\text{O}_8$ (398) ber. C 60,29 H 7,59

gef. C 60,65 H 7,83

7.1.3.3. Bis-2-butendicarbonsäure-hexadecandiylester 15

Vorschrift analog zu 7.1.3.1.; Ansatz: 1,9 g (0,02 mol) Maleinsäureanhydrid, 2,5 g (0,01 mol) 9; Ausbeute: 3,52 g (80% d.Th.); mp. 126°C;

IR-Spektrum: ν = 3300-2500 cm^{-1} (COOH), 1728 cm^{-1} (C=O, Ester), 1650 cm^{-1} (C=C), 1430 cm^{-1} (COOH);

$^1\text{H-NMR}$ -Spektrum (270 MHz, DMSO- d_6): δ = 1,28 (s, 24H, $-\text{CH}_2-$), 1,6 (m, 4H, $-\text{OCH}_2\text{CH}_2-$), 4,08 (t, 4H, $-\text{COOCH}_2-$), 6,38 ppm (d, 4H, $-\text{CH}=\text{}$);

Massenspektrum: m/e: 454 M^+ fehlt, 357 ($\text{M}-\text{C}_4\text{H}_2\text{O}_3$) $^+$ 10%;

$\text{C}_{24}\text{H}_{38}\text{O}_8$ (454) ber. C 64,44 H 8,37

gef. C 64,23 H 8,82

7.1.4. Darstellung der Maleinsäuretetrolide

7.1.4.1. 1,6,17,22-tetraoxa-cyclodotriaconta-3,19-dien-2,5,18,21-tetron 12

3,70 g (0,01 mol) von 14, 1,74 g (0,01 mol) 7 und 1 g p-Toluolsulfonsäure wurden in 800 ml absolutem Benzol 5 Stunden unter Rückfluß erhitzt. Das Lösungsmittel wurde zur Hälfte abgezogen und die ausfallende p-Toluolsulfonsäure wurde abfiltriert. Es wurde zur Trockene eingengt und der Rückstand aus 50 ml Essigester umkristallisiert.

Ausbeute: 2,2 g (42% d.Th.) mp. 97°C; $R_f = 0,67$ (Kieselgel, Benzol/Dioxan/Eisessig 90:25:4);

IR-Spektrum: $\nu = 2922, 2860 \text{ cm}^{-1}$ (CH-Valenz), $1745, 1732 \text{ cm}^{-1}$ (C=O, Ester), 1645 cm^{-1} (C=C);

$^1\text{H-NMR}$ -Spektrum (270 MHz, CDCl_3): $\delta = 1,31$ (s, 24H, $-\text{CH}_2-$), $1,68$ (m, 8H, $-\text{OCH}_2\text{CH}_2-$), $4,18$ (t, 8H, $-\text{COOCH}_2-$), $6,24$ ppm (s, 4H, $-\text{CH}=\text{}$);

Massenspektrum: m/e 508 M^+ 14%, 490 ($\text{M}-\text{H}_2\text{O}$) $^+$ 10%, 463 ($\text{M}-\text{COOH}$) $^+$ 8%;

$\text{C}_{28}\text{H}_{44}\text{O}_8$ (508) ber. C 66,14 H 8,66

gef. C 66,01 H 8,85

7.1.4.2. 1,6,19,24-tetraoxa-cyclohexatriaconta-3,21-dien-2,5,20,23-tetron 10

Vorschrift analog zu 7.1.4.1.; Ausbeute: 2,3 g (38% d.Th.) mp. 103,5°C; $R_f = 0,69$ (wie 7.1.4.1.);

IR-Spektrum: $\nu = 2921, 2858 \text{ cm}^{-1}$ (CH-Valenz), $1748, 1734 \text{ cm}^{-1}$ (C=O, Ester) 1644 cm^{-1} (C=C);

$^1\text{H-NMR}$ -Spektrum (270 MHz, CDCl_3): $\delta = 1,3$ (s, 32H, $-\text{CH}_2-$), $1,65$ (m, 8H, $-\text{OCH}_2\text{CH}_2-$), $4,2$ (t, 8H, $-\text{COOCH}_2-$), $6,3$ ppm (s, 4H, $-\text{CH}=\text{}$);

Massenspektrum: m/e : 564 M^+ 10%, 546 ($\text{M}-\text{H}_2\text{O}$) $^+$ 11%, 519 ($\text{M}-\text{COOH}$) $^+$ 9%;

$\text{C}_{32}\text{H}_{52}\text{O}_8$ (564) ber. C 68,08 H 9,22

gef. C 68,05 H 9,36

7.1.4.3. 1,6,23,28-tetraoxa-cyclotetratetraconta-3,25-dien-2,5,24,27-tetron 13

Vorschrift analog zu 7.1.4.1.; Ansatz: 3,0 g (0,0066 mol) 15, 1,7 g (0,0066 mol) 9; Ausbeute: 2,0 g (44% d.Th.) mp. 110°C;

$R_f = 0,80$ (wie 7.1.4.1.);

IR-Spektrum: $\nu = 2930, 2860 \text{ cm}^{-1}$ (CH-Valenz), $1750, 1738 \text{ cm}^{-1}$ (C=O, Ester), 1648 cm^{-1} (C=C);

^1H -NMR-Spektrum (270 MHz, CDCl_3): δ = 1,28 (s, 48H, $-\text{CH}_2-$), 1,66 (m, 8H, $-\text{OCH}_2\text{CH}_2-$), 4,16 (t, 8H, $-\text{COOCH}_2-$), 6,24 ppm (s, 4H, $-\text{CH}=\text{}$);
Massenspektrum: m/e. 676 M^+ 15%, 320 $(\text{M}-\text{C}_{20}\text{H}_{36}\text{O}_5)^+$ 25%;

$\text{C}_{40}\text{H}_{68}\text{O}_8$ (676) ber. C 71,01 H 10,05
gef. C 71,09 H 10,37

7.1.5. Rückgewinnung von 1,12-Dodecandiol 8

Die Essigestermutterlaugen der Synthesen nach 7.1.4.2. wurden vom Lösungsmittel befreit und abgewogen. Für 40 g Rückstand wurde eine Lösung von 20 g Natriumhydroxid in 200 ml Methanol hergestellt. Der Rückstand wurde bei 50°C für 2 Stunden mit der methanolischen Lösung gerührt. Die anfangs dünnflüssige Mischung wurde immer viskoser. Dann wurde die Mischung mit 12%iger Salzsäure neutralisiert, die festen Bestandteile abfiltriert und mehrmals mit Wasser gewaschen. Der Rückstand wurde luftgetrocknet und aus Ethanol/Wasser (4:1) umkristallisiert. Ausbeute: 22 g (80% d.Th.) schuppige Kristalle vom mp. $80-81^\circ\text{C}$; käufliches Produkt (Fa. Merck): mp. $78-80^\circ\text{C}$; $R_f=0,55$ (Kieselgel, Dioxan);

7.2. Photochemische und thermische Isomerisierung

7.2.1. Photochemische Isomerisierung von (Z,Z)-1,6,19,24-tetra-oxa-cyclohexatriaconta-3,21-dien-2,5,20,23-tetron 10 zu dem (E,Z)-Isomeren und dem (E,E)-Isomeren 18

400 mg (0,7 mmol) von 10 wurden in 10 ml Benzol gelöst und mit 2 Tropfen Bromwasser versetzt. Die Lösung wurde mit einer Photolampe im Abstand von 15 cm bestrahlt. Die Lösung wurde zur Trockene eingengt, in wenig Chloroform gelöst und einer präparativen Schichtchromatographie an silbernitratthaltigen Kieselgelplatten unterzogen.

Bestrahlungszeit: 1 Stunde; Laufmittel: Chloroform/Eisessig 99:1

R_f = 0,62 Ausbeute: 100 mg mp. 66°C (E,E)-Form 18

0,67 80 mg mp. 83°C (E,Z)-Form 17

0,74 120 mg mp. $103,5^\circ\text{C}$ (Z,Z)-Form 10

Bestrahlungszeit: 3 Stunden; Verhältnis (E,E)-Form 18 zu (Z,Z)-Form 10 90:10;

5 Stunden; Verhältnis (E,E)-Form 18 zu (Z,Z)-Form 10 30:70

Spektroskopische Charakterisierung der (Z,Z)-Form 10 siehe Kapitel 7.1.4.2.;

Spektroskopische Charakterisierung der (E,E)-Form 18 siehe Kapitel 7.2.2.;

(E,Z)-Form 17: IR-Spektrum: $\nu = 3080 \text{ cm}^{-1}$ (=CH-), $2925, 2860 \text{ cm}^{-1}$ (CH), $1728, 1718 \text{ cm}^{-1}$ (C=O, Ester), 1646 cm^{-1} (C=C), 1470 cm^{-1} (CH), 1302 cm^{-1} (C-O-C), 1165 cm^{-1} (C-C);

$^1\text{H-NMR}$ -Spektrum (270 MHz, CDCl_3): $\delta = 1,3$ (s, 32H, $-\text{CH}_2-$), $1,68$ (m, 8H, $-\text{OCH}_2\text{CH}_2-$), $4,20$ (m, 8H, $-\text{COOCH}_2-$), $6,24$ (d, 2H, $-\text{CH}=\text{}$), $6,86$ ppm (d, 2H, $-\text{CH}=\text{}$);

7.2.2. Thermische Isomerisierung von 10 zu (E,E)-1,6,19,24-tetraoxa-cyclohexatriaconta-3,21-dien-2,5,20,23-tetron 18

450 mg 10 wurden mit 67,8 mg Piperidin und katalytischen Mengen 2-Mercaptobernsteinsäure in 10 ml Ethanol heiß gelöst. Das Reaktionsgemisch wurde 4 Stunden bei 80°C gehalten. Beim Abkühlen fiel ein kristallines Produkt aus, daß abgesaugt und aus Methylethylketon umkristallisiert wurde.

Ausbeute: 450 mg (100% d.Th.) mp. 67°C ; $R_f = 0,66$ (wie 7.1.4.2.)

Aussehen: glasklare Plättchen durch zweimaliges Umkristallisieren aus Methylethylketon; lange Nadeln aus Isopropanol/Wasser (4:1);

IR-Spektrum: $\nu = 1718 \text{ cm}^{-1}$ (C=O, Ester), 1650 cm^{-1} (C=C, schwach);

$^1\text{H-NMR}$ -Spektrum (270 MHz, CDCl_3): $\delta = 1,3$ (s, 32H, $-\text{CH}_2-$), $1,69$ (m, 8H, $-\text{OCH}_2\text{CH}_2-$), $4,23$ (t, 8H, $-\text{COOCH}_2-$), $6,88$ ppm (s, 4H, $-\text{CH}=\text{}$);

Massenspektrum: m/e: 564 M^+ 100%;

$\text{C}_{32}\text{H}_{52}\text{O}_8$ (564) ber. C 68,08 H 9,22

gef. C 68,01 H 9,18

7.3.1. Bromaddition an den Maleinsäuredihexadecylester 16 bzw.
an den Fumarsäuredihexadecylester 19

3 g (0,005 mol) 16 bzw. 19 und 0,3 ml (0,005 mol) Brom wurden in Chloroform für 15 Minuten mit einer Photolampe bestrahlt. Dann wurde zur Trockene eingeeengt, der Rückstand mit Methanol extrahiert und aus Chloroform/Methanol 1:3 umkristallisiert.

Aus 19 entstand die Verbindung 20 (meso-Dibrombernsteinsäuredihexadecylester), aus 16 entstand die Verbindung 21 (racemisches Gemisch aus D,L-Dibrombernsteinsäuredihexadecylester).

Verbindung 20: Ausbeute: 3,2 g (83% d.Th.); mp.: 50°C; $R_f = 0,1$ (Chloroform/Methanol 15:1);

IR-Spektrum: $\nu = 2920, 2860 \text{ cm}^{-1}(\text{CH}), 1740 \text{ cm}^{-1}(\text{C=O, Ester}), 680 \text{ cm}^{-1}(\text{C-Br})$;

$^1\text{H-NMR}$ -Spektrum (270 MHz, CDCl_3): $\delta = 0,89 \text{ (t, 6H, -CH}_3\text{)}, 1,28 \text{ (s, 52H, -CH}_2\text{-)}, 1,68 \text{ (m, 4H, -OCH}_2\text{CH}_2\text{-)}, 4,24 \text{ (t, 4H, -COOCH}_2\text{-)}, 4,68 \text{ ppm (s, 2H, -CHBr)}$;

Massenspektrum: m/e: 722 M^+ 1%, 634 $(\text{M} - \text{Br})^+$ 100%;

$\text{C}_{36}\text{H}_{68}\text{Br}_2\text{O}_4$ ber. C 59,6 H 9,38
gef. C 59,2 H 9,10

Verbindung 21: Ausbeute: 1,5 g (47% d.Th.); mp.: 35°C;

$^1\text{H-NMR}$ -Spektrum (270 MHz, CDCl_3): $\delta = 0,89 \text{ (t, 6H, -CH}_3\text{)}, 1,28 \text{ (s, 52H, -CH}_2\text{-)}, 1,68 \text{ (m, 4H, -OCH}_2\text{CH}_2\text{-)}, 4,18; 4,24 \text{ (m, 4H, -COOCH}_2\text{-)}, 4,62; 4,68 \text{ ppm (s, 2H, -CHBr)}$;

$\text{C}_{36}\text{H}_{68}\text{Br}_2\text{O}_4$ ber. C 59,60 H 9,38
gef. C 58,82 H 9,15

7.3. Bromaddition an das 1,6,19,24-Tetraoxa-cyclohexatriacont-
3,21-dien-2,5,20,23-tetron 10; Tetrabromverbindungen 22
und 23

1 g (1,7 mmol) 10 wurden in 20 ml Chloroform gelöst. Zu dieser Lösung wurden 0,56 g $\hat{=}$ 0,2 ml (3,5 mmol) Brom, gelöst in 10 ml Chloroform, langsam zugetropft. Das Reaktionsgemisch wurde gleichzeitig mit einer Photolampe bestrahlt. Nach Entfärbung des Gemisches wurde das Lösungsmittel abgezogen und der Rückstand aus n-Decan umkristallisiert.

Ausbeute: 1,1 g (70% d.Th.), farblose Nadeln mp. 75°C; $R_f = 0,82$ (Kieselgel, Chloroform);

IR-Spektrum: $\nu = 1748, 1732 \text{ cm}^{-1}$ (C=O, Ester), 675 cm^{-1} (C-Br);
 $^1\text{H-NMR-Spektrum}$ (270 MHz, CDCl_3): $\delta = 1,3$ (s, 32H, $-\text{CH}_2-$), $1,68$ (m, 8H, $-\text{OCH}_2\text{CH}_2-$), $4,28$ (t, 8H, $-\text{COOCH}_2-$), $4,68$ ppm (s, 4H, $-\text{CHBr}$);
Massenspektrum: m/e: 880 M^+ 5%, $801 (\text{M-Br})^+$ 100%, $80 \text{ HBr}^{+\cdot}$;

$\text{C}_{32}\text{H}_{52}\text{O}_8\text{Br}_4$ (880) ber. C 43,64 H 5,90 Br 36,36
gef. C 43,48 H 5,95 Br -

Eine analoge Umsetzung von 12 mit Brom führte zu der Tetrabrom-
verbindung 23.

Ausbeute: 75% d.Th. mp. 72°C ; $R_f = 0,78$ (Kieselgel, Chloroform);

7.4. Doppelschichtmembranen bildende Amphiphile

7.4.1. Butandicarbonsäure, dihexadecylester, 3-sulfonat 24

$2,82 \text{ g}$ (5 mmol) 16 wurden in 100 ml Isopropanol/Wasser-Gemisch (4:1) gelöst. Eine Lösung von $0,91 \text{ g}$ (9,5 mmol) Natriumbisulfit in 2 ml Wasser (pH 7-8) wurde zugegeben. Das Reaktionsgemisch wurde 5 Stunden in einer Stickstoffatmosphäre unter Rückfluß erhitzt. Beim Abkühlen fiel das Produkt aus, wurde mit Wasser gewaschen und über P_2O_5 getrocknet.

Ausbeute: $2,28 \text{ g}$ (68% d.Th.) mp. 212°C (ab 85°C Wasserverlust);
 $R_f = 0,49$ (Kieselgel, Essigester/2-Propanol/Wasser/20% Ammoniak 8:10:4:3);

IR-Spektrum: $\nu = 1710 \text{ cm}^{-1}$ (C=O, Ester), 1300 cm^{-1} (SO_3^-), $1178, 1058 \text{ cm}^{-1}$ (SO_3^-);

$\text{C}_{36}\text{H}_{69}\text{NaO}_7\text{S} \times 1,5 \text{ H}_2\text{O}$ (667) ber. C 62,16 H 10,36 S 4,60
gef. C 62,13 H 10,31 S 4,55

7.4.2. Butandicarbonsäure, dihexadecylester, 3-(2-thiosuccinat) 25

$1,81 \text{ g}$ (12 mmol) 2-Mercaptobernsteinsäure wurden auf pH 7,2 mit 15%iger Natronlauge eingestellt. $6,9 \text{ g}$ (12 mmol) von 16 wurden in 100 ml Ethanol gelöst und die beiden Lösungen wurden vereinigt. Das Reaktionsgemisch wurde unter Rühren 4 Stunden am Rückfluß gehalten. Beim Abkühlen kristallisierte ein weißer Stoff aus, der abgesaugt und aus Ethanol/Wasser (4:1) umkristallisiert wurde.

Ausbeute: $8,1 \text{ g}$ (88% d.Th.) mp. 220°C (Z.)

IR-Spektrum: $\nu = 1738 \text{ cm}^{-1}$ (C=O, Ester), 1592 cm^{-1} (COO^-), 1415 cm^{-1} (COO^-);

$^1\text{H-NMR-Spektrum}$ (270 MHz, CD_3COOD): $\delta = 0,89$ (t, 6H, $-\text{CH}_3$), $1,3$ (s, 52H, $-\text{CH}_2-$), $1,62$ (m, 4H, $-\text{OCH}_2\text{CH}_2-$), $2,82$ (m, 2H, AB-Teil(1)),

3,06 (m, 2H, AB-Teil(2)), 3,66 (dd, 1H, X-Teil(2)), 3,98 (m, 1H, X-Teil (1)), 4,12 ppm (m, 4H, -COOCH₂-);

C₄₀H₇₂Na₂O₈S (758) ber. C 60,45 H 9,57 S 4,22

gef. C 60,58 H 9,55 S -

7.4.3. Butandicarbonsäure, dihexadecylester, 3-(2-thiolactat) 26

2,82 g (5 mmol) von 16, 0,58 g (5 mmol) 2-Thiomilchsäure, gelöst in Wasser und mit 15%iger Natronlauge auf pH 7,5 eingestellt und 0,2 ml Piperidin wurden in 100 ml Ethanol gegeben. In der Hitze bildete sich eine homogene Lösung. Das Reaktionsgemisch wurde für 3 Stunden am Rückfluß erhitzt. Das in der Kälte ausfallende Produkt wurde aus 50 ml Methanol/Wasser (3:1) umkristallisiert und über P₂O₅ getrocknet.

Ausbeute: 2,5 g (75% d.Th.) mp. 200°C (Z.);

IR-Spektrum: ν = 3450 cm⁻¹ (COO⁻), 1740 cm⁻¹ (C=O, Ester), 1580, 1405 cm⁻¹ (COO⁻);

¹H-NMR-Spektrum (270 MHz, CD₃COOD): δ = 0,89 (t, 6H, -CH₃), 1,31 (s, 52H, -CH₂-), 1,40; 1,46 (d, 3H, -CHCH₃), 1,61 (m, 4H, -OCH₂CH₂-), 2,87 (m, 2H, AB-Teil), 3,67; 3,76 (q, 1H, -CHCH₃), 3,88; 4,0 (m, 1H, X-Teil), 4,12 ppm (m, 4H, -COOCH₂-);

C₃₉H₇₃NaO₆S (692) ber. C 67,63 H 10,54 S 4,62

gef. C 67,39 H 10,48 S 4,58

7.4.4. Butandicarbonsäure, dihexadecylester, 3-(3-thiopropandiol) 27

2,82 g (5 mmol) von 16 und 0,6 g (5,5 mmol) 3-Mercapto-1,2-propandiol wurden in 60 ml Isopropanol gelöst. Katalytische Mengen Piperidin wurden zugegeben und das Reaktionsgemisch 4 Stunden unter Rühren am Rückfluß gehalten. Beim Abkühlen fiel das Produkt aus, wurde abgesaugt, mit kaltem Ethanol gewaschen und getrocknet.

Ausbeute: 1,65 g (50% d.Th.) mp. 45-46°C; R_f = 0,53 (Kieselgel, Chloroform/Methanol 5:1);

IR-Spektrum: ν = 3400 cm⁻¹ (OH), 1742 cm⁻¹ (C=O, Ester), 1415 cm⁻¹ (OH);

¹H-NMR-Spektrum (270 MHz, CDCl₃): δ = 0,88 (t, 6H, -CH₃), 1,28 (s, 52H, -CH₂-), 1,64 (m, 4H, -OCH₂CH₂-), 2,7 (m, 2H), 2,8 (m, 2H, AB-Teil), 2,94 (m, 1H), 3,56; 3,72 (m, 4H), 3,86 (m, 1H, X-Teil), 4,14 ppm (m, 4H, -COOCH₂-);

Massenspektrum: m/e: 672 M⁺ 2%, 564 (M-Diol)⁺ 12%;

$C_{39}H_{76}O_6S$ (672) ber. C 69,64 H 11,31 S 4,76

gef. C 68,98 H 11,03 S 4,69

7.4.5. Addition von 4-Acetaminobenzolsulfinsäure 28 an Malein-säuredihexadecylester 16

7.4.5.1. 4-Acetaminobenzolsulfonsäurechlorid

In einem 500 ml Kolben wurden zu 290 g Chlorsulfonsäure unter Rühren und Kühlung auf 12-15°C 67,5 g (0,5 mol) Acetanilid in kleinen Portionen gegeben. Nach der Zugabe wurde das Gemisch 2 Stunden lang auf 60°C erwärmt und anschließend langsam unter Rühren in 1 kg Eis gegeben. Das ausfallende 4-Acetaminobenzolsulfonsäurechlorid wurde abgesaugt und mit Wasser gewaschen.

Ausbeute: 92 g (74% d.Th.); weißes Pulver;

7.4.5.2. 4-Acetaminobenzolsulfinsäure 28

92 g (0,37 mol) 4-Acetaminobenzolsulfonsäurechlorid wurden 2 Stunden lang mit einer Lösung von 126 g (1 mol) Natriumsulfit in 500 ml Wasser geschüttelt. Das Reaktionsgemisch wurde durch Zugabe von 50%iger Natronlauge leicht alkalisch gehalten. Nach 2 Stunden wurde das Gemisch filtriert und das Filtrat mit 60%-iger Schwefelsäure angesäuert. Die ausfallende Sulfinsäure 28 wurde abfiltriert und aus 400 ml heißem Wasser umkristallisiert.

Ausbeute: 51,9 g (52% d.Th.) mp. 156°C (Z.);

IR-Spektrum: ν =3310, 3270 cm^{-1} (NH), 3190, 3110 cm^{-1} (sek.Amid), 3060 cm^{-1} (aromat.CH), 1670 cm^{-1} (C=O,Amid), 1605,1590 cm^{-1} (Aromat), 1540 cm^{-1} (NH,Amid), 1360 cm^{-1} (CH in CH_3), 830 cm^{-1} (p-disubst. Benzole); charakteristische Banden für Sulfinsäuren: ν =2790 cm^{-1} breit, 2450, 1085 und 1040 cm^{-1} ;

1H -NMR-Spektrum (270 MHz, CD_3OD): δ = 2,1 (s,3H,-COCH₃), 7,6 (d, 2H,aromatisch), 7,7 ppm (d,2H,aromatisch);

Massenspektrum: m/e: 199 M^+ fehlt, 173 ($M-C_2H_2$)⁺, 167 ($M-S$)⁺, 135 ($M-SO_2$)⁺, 124 ($M-C_6H_3$,disubstituiertes Benzol)⁺;

$C_8H_9O_4NS$ (199) ber. C 48,23 H 4,55 N 7,03

gef. C 48,12 H 4,69 N 7,03

7.4.5.3. Versuch der Addition von 28 an 16

20 g (35 mmol) von 16 wurden in 100 ml Ethanol gelöst, dazu wurden 7,05 g (35 mmol) 28, gelöst in 150 ml Wasser, gegeben. Das Gemisch wurde unter Stickstoff 5 Stunden unter Rückfluß erhitzt. Beim Abkühlen kristallisierte ein weißer Feststoff aus, der aus 100 ml Ethanol umkristallisiert wurde.

Ausbeute: 18,6 g; mp. 46-47°C;

Die Addition gelang nicht; anhand des Schmelzpunktes und der Dünnschichtchromatographie konnte der Feststoff als Maleinsäuredihexadecylester 16 identifiziert werden.

7.5. Bolaamphiphile

7.5.1. Symmetrische Bolaamphiphile

7.5.1.1. Natrium-1,6,19,24-tetraoxa-cyclohexatriaconta-2,5,20,23-tetraoxo-3,21 (22)-disulfonat 29

0,9 g (1,6 mmol) 10 wurden in 100 ml Isopropanol/Wasser-Gemisch (4:1) gelöst. 0,64 g (3,4 mmol) Natriumbisulfit wurden in 2 ml Wasser, auf pH 8 eingestellt, gelöst und in das Reaktionsgefäß gegeben. Das Gemisch wurde 5 Stunden lang unter Stickstoff am Rückfluß gehalten. Das Lösungsmittel wurde entfernt und der Rückstand mit heißem Methanol ausgezogen. Die methanolische Lösung wurde zur Trockene eingeeengt und der Rückstand aus heißem Wasser umkristallisiert.

Ausbeute: 0,81 g (66% d.Th.) mp. 255-260°C; $R_f = 0,58$ (Kieselgel, Wasser/Essigester/2-Propanol/Ammoniak 4:8:10:3, angefärbt mit 1,7-Dichlorfluoreszein);

IR-Spektrum: $\nu = 3450 \text{ cm}^{-1}(\text{OH})$, $2925, 2860 \text{ cm}^{-1}(\text{CH})$, $1730 \text{ cm}^{-1}(\text{C=O, Ester})$, $1230 \text{ und } 1055 \text{ cm}^{-1}(\text{SO}_3^-)$;

$^1\text{H-NMR-Spektrum}$ (270 MHz, DMSO- d_6): $\delta = 1,22$ (s, 32H, $-\text{CH}_2-$), $1,49$ (m, 8H, $-\text{OCH}_2\text{CH}_2-$), $2,77$ (dd, 2H), $2,89$ (dd, 2H), $3,66$ (dd, 2H), $3,91$ (m, 4H, $-\text{COOCH}_2-$), $3,98$ ppm (m, 4H, $-\text{COOCH}_2-$);

$\text{C}_{32}\text{H}_{54}\text{O}_{14}\text{Na}_2\text{S}_2$ (773) ber. C 49,73 H 7,05 S 8,50

gef. C 49,76 H 7,42 S 8,26

7.5.1.2. Natrium-1,6,19,24-tetraoxa-cyclohexatriaconta-2,5,20,23-tetraoxo-3,21-(22)-dithioacetat 30

2 g (3,5 mmol) 10 wurden in 120 ml Isopropanol bei 80°C gelöst. 2-Mercaptoessigsäure wurde mit 15%iger Natronlauge auf pH 7-8 eingestellt. Diese Lösung und 3 Tropfen Piperidin wurden zur isopropanolischen Lösung zugegeben. Die Reaktionsmischung wurde 1 Stunde am Rückfluß gehalten. Das ausfallende kristalline Produkt wurde abfiltriert und mit Chloroform ausgezogen. Der Rückstand wurde über Calciumchlorid/Paraffin getrocknet.

Ausbeute: 2,07 g (74% d.Th.) mp. 215°C (Z.); $R_f = 0,15$ (Kieselgel, Methanol/Chloroform 3:1);

IR-Spektrum: $\nu = 1610, 1410 \text{ cm}^{-1}(\text{COO}^-)$, $695 \text{ cm}^{-1}(\text{C-S})$;

$^1\text{H-NMR-Spektrum}$ (270 MHz, CD_3COOD): $\delta = 1,36$ (s, 32H, $-\text{CH}_2-$), 1,64 (m, 8H, $-\text{OCH}_2\text{CH}_2-$), 2,87 (m, 4H, AB-Teil), 3,53 (m, 4H, AB-Typ), 3,88 (m, 2H, X-Teil), 4,15 ppm (m, 8H, $-\text{COOCH}_2-$);

$\text{C}_{36}\text{H}_{60}\text{Na}_2\text{O}_{12}\text{S}_2 \times \text{H}_2\text{O}$ (792) ber. C 53,33 H 7,65 S 7,90
gef. C 53,23 H 7,39 S 8,08

7.5.1.3. Natrium-1,6,17,22-tetraoxa-cyclodotriaconta-2,5,18,21-tetraoxo-3,19 (20)-dithioacetat 31

Vorschrift analog zu 7.5.1.2.; Ausbeute: 75% d.Th.; mp. 208°C (Z);

$R_f = 0,10$ (Kieselgel, Methanol/Chloroform 3:1);

IR-Spektrum: $\nu = 1610, 1410 \text{ cm}^{-1}(\text{COO}^-)$, $695 \text{ cm}^{-1}(\text{C-S})$;

$^1\text{H-NMR-Spektrum}$ (270 MHz, CD_3COOD): $\delta = 1,35$ (s, 24H, $-\text{CH}_2-$), 1,65 (m, 8H, $-\text{OCH}_2\text{CH}_2-$), 2,92 (m, 4H, AB-Teil), 3,56 (dd, 4H, AB-Typ), 3,91 (q, 2H, X-Teil), 4,18 ppm (m, 8H, $-\text{COOCH}_2-$);

$\text{C}_{32}\text{H}_{50}\text{Na}_2\text{O}_{12}\text{S}_2$ (736) ber. C 52,17 H 6,79 S 8,69
gef. C 52,08 H 6,69 S 8,58

7.5.1.4. Natrium-1,6,23,28-tetraoxa-cyclotetratetraconta-2,5,24,27-tetraoxo-3,25 (26)-dithioacetat 32

Vorschrift analog zu 7.5.1.2.; Ansatz: 1 g von 10; Ausbeute:

420 mg (32% d.Th.) mp. 220°C (Z.); $R_f = 0,22$ (Kieselgel, Methanol/Chloroform 3:1);

IR-Spektrum: $\nu = 1610, 1410 \text{ cm}^{-1}(\text{COO}^-)$, $695 \text{ cm}^{-1}(\text{C-S})$;

$^1\text{H-NMR-Spektrum}$ (270 MHz, CD_3COOD): $\delta = 1,3$ (s, 48H, $-\text{CH}_2-$), 1,6 (s, 8H, $-\text{OCH}_2\text{CH}_2-$), 2,88 (m, 4H, AB-Teil), 3,54 (q, 4H, AB-Typ), 3,88 (m, 2H, X-Teil), 4,14 ppm (m, 8H, $-\text{COOCH}_2-$);

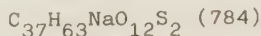
7.5.1.5. Natrium-1,6,19,24-tetraoxa-cyclohexatriaconta-2,5,20,23-3-thioacetat-21(22)-essigsäuremethylester 33

0,5 g (0,63 mmol) von 30 wurden mit 1,26 ml 1 N Salzsäurelösung in die freie Carbonsäure überführt. Zu der Säure wurden 100 ml Methanol/Wasser (10:1) gegeben. Zu dieser Suspension wurden bei Zimmertemperatur 16,5 ml etherische Diazomethanlösung im Verlauf von 3 Stunden zugetropft. Das Lösungsmittel wurde abgezogen und das Produkt über Nacht über Calciumchlorid im Exsiccator getrocknet.

Ausbeute: 0,3 g (62% d.Th.) mp. 76°C ; $R_f = 0,2$ (Kieselgel, Chloroform);

$^1\text{H-NMR-Spektrum}$ (270 MHz, CDCl_3): $\delta = 1,35$ (m, 32H, $-\text{CH}_2-$), 1,64

(m, 8H, -OCH₂CH₂-), 2,76; 2,82; 2,92; 2,98; 3,04 (m, 4H, AB-Teile), 3,38; 3,50; 3,56; 3,62 (m, 4H, AB-Typ), 3,74 (s, 3H, -COOCH₃), 3,88 (m, 2H, X-Teile), 4,16 ppm (m, 8H, -COOCH₂-);



7.5.1.6. 1,6,19,24-tetraoxa-cyclohexatriaconta-2,5,20,23-tetraoxo-3,21(22)-dithiopropandiol 34

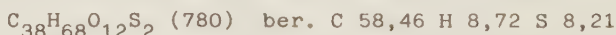
1 g (1,7 mmol) 10, 0,5 g (4,6 mmol) 3-Mercapto-1,2-propandiol und 3 Tropfen Piperidin wurden in 100 ml Isopropanol gelöst. Die Reaktionsmischung wurde 4 Stunden am leichten Rückfluß gehalten. Beim Abkühlen fiel eine weißer Feststoff aus, der abgesaugt und über Calciumchlorid/Paraffin getrocknet wurde. Das Produkt wurde aus Isopropanol umkristallisiert.

Ausbeute: 0,9 g (65% d.Th.) mp. 82°C; R_f = 0,28 (Kieselgel, Benzol/Dioxan/Eisessig 90:25:4);

IR-Spektrum: ν = 3420 cm⁻¹(OH), 1740 cm⁻¹(C=O, Ester), 1415 cm⁻¹(OH, Deformation);

¹H-NMR-Spektrum (270 MHz, CDCl₃): δ = 1,3 (s, 32H, -CH₂-), 1,62 (m, 8H, -OCH₂CH₂-), 2,72; 2,82; 2,94 (m, 10H), 3,56; 3,72; 3,86 (m, 10H), 4,14 ppm (m, 8H, -COOCH₂-);

Massenspektrum: m/e: 780 M⁺ 1%, 672 (M-Diol)⁺ 100%;

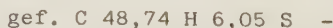
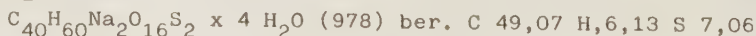


7.5.1.7. Natrium-1,6,19,24-tetraoxa-cyclohexatriaconta-2,5,20,23-tetraoxo-3,21(22)-dithiosuccinat 35

Vorschrift analog zu 7.5.1.2.; Ansatz: 1 g (1,7 mmol) 10, 0,55 g (3,5 mmol) 2-Mercaptobernsteinsäure (pH 7,2); Ausbeute: 1,0 g (65% d.Th.) mp. 270°C (Z.); R_f = 0,07 (Kieselgel, Methanol/Eisessig 99:1);

IR-Spektrum: ν = 3450 cm⁻¹(OH), 1595, 1415 cm⁻¹(COO⁻), 695 cm⁻¹(C-S);

¹H-NMR-Spektrum (270 MHz, CD₃COOD): δ = 1,36 (s, 32H, -CH₂-), 1,64 (m, 8H, -OCH₂CH₂-), 2,84 (m, 4H, AB-Teil(1)), 3,04 (m, 4H, AB-Teil(2)), 3,56 (m, 2H, X-Teil(2)), 3,96 (m, 2H, X-Teil(1)), 4,14 ppm (m, 8H, -COOCH₂-);



7.5.2. Unsymmetrische Bolaamphiphile

7.5.2.1. Natrium-1,6,19,24-tetraoxa-cyclohexatriaconta-2,5,20,23-tetraoxo-3-en-21(22)-sulfonat 36

0,85 g (1,5 mmol) 10 wurden in einem Isopropanol/Wasser-Gemisch (4:1) in der Hitze gelöst. Dann wurde die Lösung von Natriumbisulfid in 2 ml Wasser (pH 8) zugegeben. Die Reaktionsmischung wurde 5 Stunden unter Rückfluß gehalten. Das Lösungsmittel wurde abgezogen und der Rückstand mit Essigester ausgezogen. Nach dem Abfiltrieren wurde mit eiskaltem Wasser nachgewaschen, um das Produkt von Natriumhydrogensulfid zu befreien. Der getrocknete Rückstand wurde mit Aceton aufgeköcht. Aus der acetonischen Lösung fiel beim Abkühlen das Monoaddukt aus.

Ausbeute: 330 mg (30% d.Th.) mp. 125°C;

IR-Spektrum: ν = 3450 cm⁻¹(OH), 3060 cm⁻¹(=CH-), 2930, 2860 cm⁻¹(CH), 1740 cm⁻¹(C=O,Ester), 1640 cm⁻¹(C=C), 1240 und 1055 cm⁻¹(SO₃⁻);

¹H-NMR-Spektrum (270 MHz, CDCl₃): δ = 1,25 (s,32H,-CH₂-), 1,6 (m,8H,-OCH₂CH₂-), 2,8; 2,9 (dd,2H,AB-Teil), 3,62 (q,1H,X-Teil), 4,0 (m,8H,-COOCH₂-), 6,45 ppm (d,2H,-CH=);

C₃₂H₅₃NaO₁₁S (669) ber. C 57,45 H 8,00 S 4,79
gef. C 56,53 H 8,09 S 4,64

7.5.2.2. Natrium-1,6,19,24-tetraoxa-cyclohexatriaconta-2,5,20,23-tetraoxo-3-en-21(22)-thiosuccinat 37

0,39 g (2,6 mmol) 2-Mercaptobernsteinsäure wurden mit 15%iger Natronlauge auf pH 7,2 eingestellt. 1,65 g (2,9 mmol) 10 wurden in Isopropanol in der Hitze gelöst. Zu dieser Lösung gab man das Natriumsalz der 2-Mercaptobernsteinsäure und katalytische Mengen Piperidin. Es war darauf zu achten, daß eine homogene Lösung entsteht. Nach dem Abziehen des Lösungsmittels wurde zweimal mit heißem Aceton ausgezogen und der Rückstand auf einer D3-Fritte vorsichtig mit eiskaltem Wasser gewaschen und anschließend im Vakuumtrockenschrank bei 70°C getrocknet.

Ausbeute: 1,5 g (70% d.Th.) mp. 240°C (Z.); R_f = 0,16 (wie 7.5.1.1.);

IR-Spektrum: ν = 3320 cm⁻¹(OH), 3060 cm⁻¹(=CH-), 2925, 2860 cm⁻¹(CH), 1735 cm⁻¹(C=O,Ester), 1630 (C=C), 1580, 1440 cm⁻¹(COO⁻), 700 cm⁻¹(C-S);

¹H-NMR-Spektrum (270 MHz, CD₃COOD): δ = 1,32 (s,32H,-CH₂-), 1,64

(m,8H,-OCH₂CH₂-), 2,87 (m,2H,AB-Teil(1)), 2,96 (m,2H,AB-Teil(2)), 3,66 (t,1H,X-Teil(2)), 3,96 (m,1H,X-Teil(1)), 4,14 (m,8H,-COOCH₂-), 6,88 ppm (dd,2H,-CH=);

C₃₆H₅₆Na₂O₁₂S (758) ber. C 56,99 H 7,39 S 4,22

gef. C 56,82 H 7,31 S 4,18

7.5.2.3. Natrium-1,6,19,24-tetraoxa-cyclohexatriaconta-2,5,20,23-tetraoxo-3-thiosuccinat-21(22)-sulfonat 38

0,19 g (1 mmol) Natriumbisulfid wurden in 2 ml Wasser gelöst. Die Lösung wurde mit pH-Meter und verdünnter Natronlauge auf pH 8 eingestellt. 1,52 g (2 mmol) 37 wurden in 100 ml eines Isopropanol/Wasser-Gemisches (4:1) in der Hitze gelöst und die Salzlösung wurde zugegeben. Die Mischung wurde 5 Stunden unter Stickstoff am Rückfluß gehalten. Die Lösung wurde über Nacht stehengelassen und das Lösungsmittel abgesaugt. Der Rückstand wurde mit heißem Methanol ausgezogen. Das Lösungsmittel wurde abdestilliert und ein weißes kristallines Produkt wurde erhalten.

Ausbeute: 1,2 g (70% d.Th.) mp. 290°C (Z.);

IR-Spektrum: ν 3300 cm⁻¹(OH), 2920,2854 cm⁻¹(CH), 1732 cm⁻¹(C=O, Ester), 1595, 1410 cm⁻¹(COO⁻), 1240, 1040 cm⁻¹(SO₃⁻), 702 cm⁻¹(C-S);

¹H-NMR-Spektrum (270 MHz, CF₃COOD): δ = 1,42 (s,32H,-CH₂-), 1,79 (m,8H,-OCH₂CH₂-), 2,82-3,49(m,6H,AB-Teile), 3,94 (t,1H,X-Teil(2)) 4,12 (m,1H,X-Teil(1)), 4,36 (m,8H,-COOCH₂-), 4,59 ppm (m,1H,X-Teil);

(270 MHz, CD₃COOD): δ = 1,34 (s,32H,-CH₂-), 1,68 (m,8H), 2,8-3,2 (m,6H), 3,43 (t,1H), 3,65 (m,1H), 3,97 (m,1H), 4,18 ppm (m,8H);

C₃₆H₅₇Na₃O₁₅S₂ (862) ber. C 50,12 H 6,61 S 7,42

gef. C 49,92 H 6,54 S 7,36

Die freie Säureform wurde durch Titration mit verdünnter Salzsäure und Extraktion mit Essigester erhalten. R_f = 0,25 (Kieselgel,Benzol/Dioxan/Eisessig 90:25:4);

C₃₆H₅₉NaO₁₅S₂ (818) ber. C 52,81 H 7,21 S 7,82

gef. C 52,64 H 7,13 S 7,74

7.5.2.4. Natrium-1,6,17,22-tetraoxa-cyclodotriaconta-2,5,18,21-tetraoxo-3-en-19(20)-thiosuccinat 39

Vorschrift analog zu 7.5.2.2.;

^1H -NMR-Spektrum (270 MHz, CD_3COOD): $\delta = 1,32$ (s, 24H, $-\text{CH}_2-$), 1,64 (m, 8H, $-\text{OCH}_2\text{CH}_2-$), 2,7-3,14 (m, 4H, AB-Teile), 3,66 (t, 1H, X-Teil (2)), 3,96 (m, 1H, X-Teil(1)), 4,14 (m, 8H, $-\text{COOCH}_2-$), 6,88 ppm (d, 2H, $-\text{CH}=\text{}$);

$\text{C}_{32}\text{H}_{48}\text{Na}_2\text{O}_{12}\text{S}$ (702,7) ber. C 54,69 H 6,88 S 4,56
gef. C 54,12 H 6,60 S 4,41

7.5.2.5. Natrium-1,6,17,22-tetraoxa-cyclodotriaconta-2,5,18,21-tetraoxo-3-sulfonat-19(20)-thiosuccinat 40

Vorschrift analog zu 7.5.2.3.

IR-Spektrum: $\nu = 3440\text{ cm}^{-1}$ (COOH), $2922, 2858\text{ cm}^{-1}$ (CH), 1745 cm^{-1} (C=O, Ester), 1715 cm^{-1} (C=O, COOH), 1040 cm^{-1} (S=O), 920 cm^{-1} (COOH, oop);

^1H -NMR-Spektrum (270 MHz, $\text{CD}_3\text{OD}/\text{D}_2\text{O}$): $\delta = 1,3$ (s, 24H, $-\text{CH}_2-$), 1,66 (m, 8H, $-\text{OCH}_2\text{CH}_2-$), 2,54 (m, 2H, AB-Teil), 2,70 (m, 2H, AB-Teil), 2,88 (m, 2H, AB-Teil), 3,66 (t, 1H, X-Teil), 3,94 (m, 2H, X-Teile), 4,16 ppm (m, 8H, $-\text{COOCH}_2-$);

$\text{C}_{32}\text{H}_{48}\text{Na}_3\text{O}_{15}\text{S}_2$ (805) ber. C 47,70 H 5,96 S 7,95
gef. C 47,55 H 5,83 S 7,88

7.6. Monosubstituierte Bernsteinsäurederivate als Vergleichs-
substanzen

7.6.1. 3-Sulfobernsteinsäurediethylester 41

8,6 g (0,05 mol) Maleinsäurediethylester und 4,75 g (0,025 mol) Natriumbisulfit wurden in 50 ml Wasser gelöst. Das Reaktionsgemisch wurde unter starkem Rühren 2 Stunden am Rückfluß gehalten. Beim Abkühlen fiel das Produkt aus, wurde abgesaugt und aus Essigester umkristallisiert.

Ausbeute: 12 g (90% d.Th.) mp. 80°C ;

^1H -NMR-Spektrum (270 MHz, D_2O): $\delta = 1,24$ (t, 3H, $-\text{CH}_3$), 1,3 (t, 3H, $-\text{CH}_3$), 3,12 (m, 2H, AB-Teil), 4,18 (q, 2H, $-\text{COOCH}_2-$), 4,24 (m, 1H, X-Teil), 4,28 ppm (q, 2H, $-\text{COOCH}_2-$);

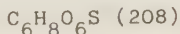
$\text{C}_8\text{H}_{13}\text{NaO}_7\text{S}$ (276)

7.6.2. Carboxomethylthiobernsteinsäure 42

11,6 g (0,1 mol) Maleinsäure und 9,2 g (0,1 mol) 2-Mercaptoessigsäure wurden in 50 ml Wasser gelöst. Die Mischung wurde 3 Stunden unter Rückfluß erhitzt. Das ausfallende Produkt wurde abgesaugt und aus 50 ml Essigester umkristallisiert.

Ausbeute: 9,7 g (43% d.Th.) mp. $135-137^\circ\text{C}$;

^1H -NMR-Spektrum (270 MHz, D_2O): $\delta = 2,96$ (m, 2H, AB-Teil), 3,56 (dd, 2H, AB-Typ), 3,84 ppm (m, 1H, X-Teil);

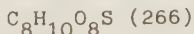


7.6.3. 3-Bernsteinsäure-(2-thiobernsteinsäure) 43

Vorschrift analog zu 7.6.2.; Umkristallisation aus Methanol;

Ausbeute: 14 g (53% d.Th.) mp. 196-197°C;

^1H -NMR-Spektrum (270 MHz, D_2O): $\delta = 2,18$ (m, 2H, AB-Teil(1)), 2,32 (m, 2H, AB-Teil(2)), 3,1 (m, 1H, X-Teil(2)), 3,2 (m, 1H, X-Teil(1)), 10,4 ppm (breit, 2H, -COOH);



7.6.4. 3-Bernsteinsäure-(2-thiomilchsäure) 44

Vorschrift analog zu 7.6.2.; mp. 164°C; Ausbeute: 20g (90% d.Th.)

^1H -NMR-Spektrum (270 MHz, D_2O): $\delta = 1,44$ (d, 3H, -CH₃), 2,96 (m, 2H, AB-Teil), 3,78 (m, 1H, X-Teil), 3,9 ppm (q, 1H, -CH-CH₃);



7.6.5. Carboxomethylsulfinbernsteinsäure 45

1 g (5 mmol) 42 wurde in 100 ml Essigester gelöst und auf -70°C in einer Trockeneis-Methanol-Mischung gekühlt. Die Lösung wurde mit 0,258 g (0,01 mol) Ozon umgesetzt und anschließend 15 Minuten mit Stickstoff durchgespült. Der Essigester wurde abgezogen und es blieb ein weißer Feststoff zurück, der aus Isopropanol umkristallisiert wurde.

Ausbeute: 0,5 g (46% d.Th.) mp. 227°C;

^1H -NMR-Spektrum (60 MHz, D_2O) $\delta = 3,1$ (m, 2H, -C-CH₂-COO), 4,05 (m, 2H, -CH₂-SO-), 4,35 ppm (m, 1H, -SO-CH-);

(270 MHz, D_2O , gealterte Lösung): $\delta 3,1$ (m, 2H, -C-CH₂-COO), 3,7-4,3 (m, 2H, -CH₂-SO), 4,4 (q, 1H (50% H-D-Austausch), -SO-CH-);

(270 MHz, $\text{D}_2\text{O}/\text{NaOD}$): 100% H-D-Austausch der diastereotopen -CH₂-SO-Protonen und 100% H-D-Austausch des -SO-CH-Protons. $\delta = 2,78$ (s, 2H, -C-CH₂-COO);

7.6.6. H-D-Austausch an Verbindung 41 in $\text{NaOD}/\text{D}_2\text{O}$

Es findet zwar, der H-D-Austausch des Protons bei $\delta = 4,3$ ppm statt, aber gleichzeitig Hydrolyse der Esterbindungen und Auftauchen von Ethanol-Peaks bei $\delta = 1,2$ und 3,7 ppm.

7.6.7. DC-Untersuchung an den Sulfobernsteinsäureverbindungen

Die Verbindungen 24, 29 und 41 wurden in Methanol gelöst und mit Natrium versetzt. Nach Auflösen des Natriums wurden die

Lösungen dünnschichtchromatographisch untersucht (Kieselgel, Methanol). Es konnte anhand der R_f -Werte die Bildung von Hexadecanol und 1,12-Dodecandiol nachgewiesen werden (siehe 7.10.6.).

7.6.8. H-D-Austausch der Verbindung 42 in NaOD/D₂O

Aus dem 270 MHz ¹H-NMR-Spektrum der Verbindung 42 in D₂O geht hervor, daß das Proton bei 3,84 ppm nicht ausgetauscht wird, im Gegensatz zur Verbindung 45 die vollständig austauscht.

7.7. Phosphorsäureester als membranbildende Amphiphile

7.7.1. Doppelschichtmembranen aus Phosphorsäuredialkylestern

7.7.1.1. Phosphorsäuredihexadecylester 46 ⁷¹

1,54 g (10 mmol) Phosphoroxychlorid und drei Äquivalente - 10,9g (0,03 mol)- 1-Hexadecanol wurden für 8 Stunden in 250 ml Benzol unter Rückfluß erhitzt. Das Lösungsmittel wurde abgezogen und der Rückstand zweimal aus 100 ml Benzol umkristallisiert. Ausbeute: 9 g (70% d.Th.) mp. 68°C;

7.7.1.2. Phosphorsäuredioctadecylester 47

Vorschrift analog zu 7.7.1.1.; halber Ansatz; Ausbeute: 4,1 g (74% d. Th.) mp. 74°C; weißer Feststoff;

IR-Spektrum: ν = 1215 cm⁻¹(P=O), 1068 cm⁻¹(P-O-C, aliphatisch);

¹H-NMR-Spektrum (100 MHz, CDCl₃): δ = 0,85 (t, 6H, -CH₃), 1,25 (m, 60H, -CH₂-), 1,64 (m, 4H, -OCH₂CH₂-), 4,0 (q, 4H, -POOCH₂-), 12,0 ppm (s, 1H, -POOH);

Massenspektrum: m/e: 602 M⁺ 100%;

C₃₆H₇₅O₄P (602) ber. C 71,76 H 12,46 P 5,15
gef. C 71,25 H 12,41 P -

7.7.2. Einschichtige Membranen aus Phosphorsäuretetroliden

7.7.2.1. Bis-phosphorsäure-didodecandiy-l-tetron 48

5 g (0,025 mol) 1,12-Dodecandiol 8 und 1,2 ml (0,0125 mol) frisch destilliertes POCl₃ wurden in 800 ml Benzol gelöst. Die Reaktionsmischung wurde unter Stickstoff für 18 Stunden bei 40°C gehalten. Man gab stöchiometrische Menge an Pyridin zu. Dann wurden die gleichen Mengen POCl₃ und Pyridin zugegeben und die Reaktionslösung wurde für weitere 10 Stunden bei gleicher Temperatur gehalten. Der Niederschlag wurde abfiltriert. Das Filtrat wurde mit 0,5 ml Wasser versetzt und 30 Minuten auf 80°C erhitzt. Das Lösungsmittel wurde entfernt und ein glasartiger Rückstand blieb

im Kolben zurück. Der Rückstand wurde mit Aceton ausgezogen und getrocknet.

Ausbeute: 0,9 g (10% d.Th.) mp. 125°C; $R_f = 0,28$ (Kieselgel, Methanol);

IR-Spektrum: $\nu = 2400, 1700$ und 1635 cm^{-1} (POOH), 1230 cm^{-1} (P=O), 1045 cm^{-1} (P-O-C, aliphatisch);

Massenspektrum: m/e: 528 M^+ 20%, 265 $(M/2+1)^+$ 100%, 99 $H_4PO_4^{+}$;

$C_{24}H_{50}O_8P_2$ (528) ber. C 54,60 H 9,50 P 11,7

gef. C 54,74 H 9,72 P 9,15

7.7.2.2. Bis-phosphorsäure-didodecandiyl-tetron, dimethylester 49

0,5 g (1 mmol) 48 wurde in 10 ml Methanol suspendiert und tropfenweise mit 5 ml 6%iger etherischer Diazomethanlösung versetzt.

Die Reaktion wurde dünnschichtchromatographisch verfolgt. Das Lösungsmittel wurde abgezogen und es blieb ein glasartiger Film am Kolbenrand.

Ausbeute: 0,53 g (100% d.Th.); $R_f = 0,5$ (Kieselgel, Chloroform/Methanol 1:5, Molybdätophosphorsäure, 3,5%iges Sprühreagenz);

1H -NMR-Spektrum (100 MHz, CD_3OD): $\delta = 1,36$ (m, 32H, $-CH_2-$), 1,72 (m, 8H, $-OCH_2CH_2-$), 3,56 (t, 2H, $-CH_2OH$), 3,76 (d, 6H, $-POOCH_3$ ($J_{HP} = 11 \text{ Hz}$)), 4,1 ppm (q, 6H, $-POOCH_2-$) (frische Lösung);

(270 MHz, CD_3OD): $\delta = 1,3$ (m, 32H, $-CH_2-$), 1,68 (m, 8H, $-OCH_2CH_2-$), 3,54 (t, 2H, $-CH_2OH$), 3,73; 3,77 (d, 2H, $-POOCH_3$), 3,94; 4,08 ppm (q, 6H, $-POOCH_2-$) (gealterte Lösung);

Massenspektrum: m/e: 556 M^+ 80%;

$C_{26}H_{54}O_8P_2$ (556) ber. C 56,10 H 9,70 P 11,15

gef. C 55,84 H 10,02 P -

7.7.2.3. Bis-phosphorsäure-dihexadecandiyl-tetron 50

Vorschrift analog zu 7.7.2.1.; halber Ansatz; Ausbeute: 100 mg (8% d.Th.) mp. 135°C;

IR-Spektrum: ν 3390 cm^{-1} (breit, POOH), 2915, 2842 cm^{-1} (CH), 1630, 1465 cm^{-1} (POOH), 1222 cm^{-1} (P=O), 1070 cm^{-1} (P-O-C, aliphatisch);

1H -NMR-Spektrum (100 MHz, $CDCl_3$): $\delta = 1,29$ (s, 48H, $-CH_2-$), 1,56 (m, 8H, $-OCH_2CH_2-$), 3,85 ppm (q, 8H, $-POOCH_2-$);

Derivatisierung mit etherischer Diazomethanlösung in Methanol:

Massenspektrum: m/e: 668 M^+ 100%;

$C_{32}H_{66}O_8P_2$ (640) ber. C 60,00 H 10,31 P 9,69

gef. C 59,31 H 10,44 P -

7.7.3. Vesikelpräparation

Zur Vesikelpräparation siehe Kapitel 7.10.1; Beschallung bei

pH 8-9; Zeit:30 Minuten; Anfärbemittel: 1%ige Uranylacetatlösung; elektronenmikroskopische Vergrößerung 40 000 :1; Gesamtvergrößerung: etwa 80 000 :1;

7.7.3.1. Komplexierung der Phosphatvesikel 48, Dialyseexperiment

Eine 10^{-3} M Lösung von 48 in Wasser und eine 2×10^{-3} M $K_3Fe(CN)_6$ -Lösung wurden für 30 Minuten zusammenbeschallt. Danach wurde die Vesikellösung in einem Dialyseschlauch (Ausschlußgröße 10 000) gefüllt und 48 Stunden gegen Wasser bei $60^\circ C$ dialysiert. Es ergab sich eine leicht trübe gelbliche Lösung, die nach einer erneuten Beschallung (15 Minuten) klar wurde.

7.7.4. Oberflächenspannungsmessungen

Verbindung	Konzentration	Temperatur	Oberflächenspannung
<u>48</u>	1mg/ml	20 ($^\circ C$)	40 (dyn/cm)
<u>50</u>	1mg/ml	20	39
<u>48</u>	1mg/ml	50	35
<u>50</u>	1mg/ml	50	31

7.8. "Nicht-Amphiphile"

7.8.1. Carminsäure 54

Carminsäure 54 kristallisiert in roten Prismen aus Methanol/Wasser. mp. $130^\circ C$ (Z.); $R_f = 0,17$ (Kieselgel, 1-Propanol/Ammoniak/ Wasser 6:3:1); Löslichkeit: 130 mg/100 ml Wasser, 3,34 g/100 ml Pyridin, wenig löslich in Ethanol und Ether, unlöslich in Benzol;

Elektronenspektrum in Wasser: $\lambda = 541nm$ (4400), $512nm$ (5000), $486nm$ (3600), $323nm$ (5600), $281nm$ (16400);

Massenspektrum: m/e: 492 M^+ fehlt, 473 ($M-H_2O + H$) $^+$;

(FAB): m/e: 473 + verschiedene Natriumcluster;

IR-Spektrum: $\nu = 3600-2300\text{ cm}^{-1}$ (breit, OH und COOH), $1800-1550\text{ cm}^{-1}$ (breit, C=O und aromatische Ringschwingung), $1500-1050\text{ cm}^{-1}$ (breit, aromatische Ringschwingung, OH, COOH, COC und C-C);

7.8.2. Carminsäureoctaacetat 55

1,7 g (3,5 mmol) 54, 17 g (0,16 mol) Acetanhydrid und 4-5 Tropfen konz. Schwefelsäure wurden bei Raumtemperatur 3 Tage gerührt. Die dunkelbraune Lösung wurde auf etwas Eiswasser gegossen und das ausfallende Produkt abgesaugt. Die Umkristallisation aus 25 ml 95%igem Methanol ergab orange Kristalle. Man kann die Reaktionszeit durch Erhitzen auf $80^\circ C$ auf 1 Stunde verkürzen.

Ausbeute: 1 g (35% d.Th.) mp. 157°C; $R_f = 0,7$ (Kieselgel, Methanol/Chloroform 3:1);

IR-Spektrum: $\nu = 2950 \text{ cm}^{-1}$ (CH), 1790 cm^{-1} (C=O, arom. Ester), 1755 cm^{-1} (C=O, aliph. Ester), 1680 cm^{-1} (C=O, arom. Keton), 1632 cm^{-1} (C=C, Arom.), 1581 cm^{-1} (arom. Ringschwingung), 1440 cm^{-1} (CH), 1375 cm^{-1} (COOH), 1230, 1192, 1120 cm^{-1} (C-O und C-C);

Elektronenspektrum in Methanol: $\lambda = 225 \text{ nm}$ (26500), 284 nm (32750), 456 nm (6800), 489 nm (6400), 528 nm (4100);

$^1\text{H-NMR}$ -Spektrum (270 MHz, CDCl_3): $\delta = 1,8 - 3$ (m, 24H, $-\text{COCH}_3$), 3,5 - 6 ppm (m, 8H, CH-Zucker und Aryl- CH_3);

Massenspektrum (FAB): m/e: 851 ($\text{M} + \text{Na}$)⁺-Cluster

$\text{C}_{38}\text{H}_{36}\text{O}_{21}$ (828) ber. C 55,07 H 4,35

gef. C 55,01 H 4,30

7.8.3. Octaacetylcarminsäuremethylester 56

900 mg (1,1 mmol) von 55 wurden nach der Allgemeinen Arbeitsvorschrift des Organikums so lange mit etherischer Diazomethanlösung versetzt, bis keine Stickstoffentwicklung mehr zu beobachten war. Das Lösungsmittel wurde abrotiert, der Rückstand mit Ether aufgenommen und die nicht umgesetzte Carminsäure 54 mit verdünnter Natronlauge und Wasser ausgewaschen. Die etherische Phase wurde über Magnesiumsulfat getrocknet. Nach dem Entfernen des Ethers blieb ein gelber kristalliner Rückstand im Kolben.

Ausbeute: 350 mg (38% d.Th.) mp. 128°C; $R_f = 0,8$ (Kieselgel, Chloroform);

IR-Spektrum: $\nu = 2938, 2862 \text{ cm}^{-1}$ (CH), 1785 cm^{-1} (C=O, arom. Ester), 1758 cm^{-1} (C=O, aliph. Ester), 1684 cm^{-1} (C=O, arom. Keton), 1585 cm^{-1} (arom. Ringschwingung), 1440, 1372 cm^{-1} (CH_3); Elektronenspektrum in Chloroform: $\lambda = 344 \text{ nm}$ (3200), 264 nm (25200);

$^1\text{H-NMR}$ -Spektrum (270 MHz, CDCl_3): $\delta = 1,8 - 3$ (m, 24H, $-\text{COCH}_3$), 3,95 (s, 3H, $-\text{COOCH}_3$), 3,5 - 6 ppm (m, 8H, CH-Zucker und Aryl- CH_3); Massenspektrum: m/e: 842 M^+ fehlt, 827 ($\text{M} - \text{CH}_3$)⁺, 799 ($\text{M} - \text{CO}_2 + \text{H}$)⁺;

$\text{C}_{39}\text{H}_{38}\text{O}_{21}$ (842) ber. C 55,58 H 4,51

gef. C 55,42 H 4,46

7.8.4. Vesikelpräparation

Eine 10^{-3} M Carminsäuresuspension in Wasser wurde 30 Minuten bei 40°C

beschallt. Es ergab sich eine klare rote Vesikellösung. Phenolphthalein 52 und Bromthymolblau 53 wurden in Konzentrationen von 0,5 mg/ml Wasser bei pH 8 bzw. pH 7 1 Stunde beschallt. Es ergeben sich leicht trübe Lösungen.

7.8.4.1. Titration einer Carminsäurelösung

Eine 10^{-3} M beschallten Carminsäurelösung wurde mit 0,1 ml - 0,3 ml 0,01 N NaOH-Lösung titriert. Als Vergleichslösung wurde eine 10^{-3} M methanolische unbeschallte Lösung titriert.

methanolische Lösung: $\lambda = 492$ nm (0,8), + 0,1ml 0,01 N NaOH 510 nm (1,12) und 545nm (0,94); + 0,2 ml 0,01 N NaOH 520 (1,14) und 552 nm (1,12); + 0,3 ml 0,01 N NaOH 558nm (1,06).

beschallte Lösung: $\lambda = 489$ nm (0,64); + 0,1 ml 0,01 N NaOH 491nm (1,08); + 0,2 ml 0,01 N NaOH 514nm (0,8) und 545nm (0,7); + 0,3 ml 0,01 N NaOH 525nm (0,68) und 552nm (0,72).

Die methanolische Lösung wurde jeweils nach 1 Minute, die beschallte Lösung jeweils nach 30 Minuten nach der Zugabe von NaOH vermessen.

7.8.5. Vesikelpräparation von 55

Eine 10^{-4} M Suspension von 55 in Wasser wurde 30 Minuten beschallt. Es ergab sich eine orangerote klare Lösung. Die

7.8.5.1. Titration von 55

55: $\lambda = 530$ nm (0,47); + 0,5 ml 0,01 N NaOH 525nm (0,29) und 568 nm (0,28); + 0,1ml 10%ige Triton X 100 570nm (0,35). Die Messung erfolgte 5 Minuten nach der Zugabe.

7.9. Magnesium-octaethylporphin (MgOEP) 59 ^{112,113}

950 mg Octaethylporphin wurden in 100 ml über KOH und 4Å - Molekularsieben getrocknetem und destilliertem Pyridin gelöst. 5 g wasserfreies Magnesiumperchlorat wurde hinzugefügt und die Lösung wurde 6 Stunden am leichten Sieden gehalten (Trockenrohr, Aluminiumfolie). Die Pyridinlösung wurde über Nacht stehen gelassen und das Magnesium-octaethylporphin x 2 Pyridinat kristallisierte in schönen violetten Kristallen aus. Die Kristalle wurden abgesaugt und im Vakuum bei 60°C getrocknet. Ausbeute: 1,28 g (100% d.Th.);

Der so dargestellte Magnesiumkomplex ist ein Dipyridinat.

Obwohl Magnesium-porphyrine außergewöhnlich säurelabil sind, lassen sich in etherischer Lösung die koordinativ gebundenen Pyridinmoleküle mit 0,1 N HCl entfernen, ohne daß Entmetallierung auftritt.

Dazu wurden 60 mg des Magnesium-octaethylporphin-dipyridinats in 300 ml Ether gelöst, zweimal mit je 200 ml 0,1 N HCl gewaschen, mit Natriumbicarbonat neutralisiert und zweimal mit je 100 ml Wasser nachgewaschen. Die etherische Phase wurde mit wenig Benzol versetzt und zur Trockene abdestilliert. Die Kristallisation erfolgte aus Benzol-Petrolether (30-60°C). Ausbeute: 40 mg;

Die Metallierung und die Charakterisierung von MgOEP 59 kann mit der Aufnahme von Elektronenspektren verfolgt werden bzw. erfolgen. Die Metallierung wurde über das Verschwinden der α -Bande des OEPs bei $\lambda = 616$ nm verfolgt. Elektronenspektrum von MgOEP 59 in methanolischer Lösung: $\lambda = 579$ nm (17700), 540 nm (17500), 406 nm (460 000);

7.10. Charakterisierung der Bernsteinsäure- und Phosphorsäureamphiphile

7.10.1. Vesikelpräparation

Im allgemeinen wurden 5-20 mg der Amphiphile in einem organischen Lösungsmittel (Chloroform oder Methanol) gelöst. Das Lösungsmittel wurde abgezogen und der sich bildende Lipidfilm 24 Stunden im Vakuumtrockenschrank bei 50°C (50 Torr) getrocknet. Dann wurden 10 ml bidestilliertes Wasser zugefügt und die Suspension wurde 3-5 Minuten beschallt. Die maximale Energie betrug 30-40 Watt. Die homogenisierte Lösung wurde in ein Thermostatisiergefäß überführt und 30-60 Minuten bei etwa 50°C weiterbeschallt.

7.10.1.1. Vesikelpräparation mit Fremdzusätzen

Für die Einschlußexperimente und die pH-Variation wurden die entsprechenden Zusätze entweder vor der Präparation des Lipidfilms oder zur wäßrigen Phase hinzugegeben.

7.10.2. Herstellung der elektronenmikroskopischen Präparate

Die klaren, leicht bis stärker opaleszierenden Vesikellösungen wurden für die elektronenmikroskopischen Untersuchungen weiterpräpariert.

7.10.2.1. Befilmung der Trägernetze

Als Trägermaterial für die zu untersuchende Substanz dienten Cu/Pd-Netze mit einem Durchmesser von 3,05 mm, die 400 Felder aufwiesen. Die Netze waren erst mit einem Kollodium-, dann mit einem Kohlefilm beschichtet. Die Substanzpräparation erfolgte

immer auf der Kohleschicht.

Die befilmten Cu/Pd-Netze wurden auf einen Objektträger gelegt. Ein Tropfen der zu untersuchenden Lösung wurde mit einer Kapillare auf das Netz aufgebracht. Um zu vermeiden, daß das Netz sich mit dem Flüssigkeitstropfen vom Objektträger abhebt, muß es an einem nicht von Flüssigkeit benetzten Ende mit einer fein ausgezogenen Pinzette auf der Unterlage angedrückt werden. Der Tropfen mit der zu untersuchenden Lösung wurde nach einigen Minuten von der Seite her mit einem Filterpapier abgesaugt. Ein Tropfen Kontrastmittellösung (1%ige Uranylacetat oder 1%ige Ammoniummolybdatlösung) wurde auf die gleiche Art und Weise aufgebracht und nach kurzer Zeit (eine bis wenige Minuten) wieder mit einem Filterpapier abgesaugt. In einer zweiten Variante wurde ein Tropfen zu untersuchende Lösung mit einem Tropfen Kontrastmittel vermischt und in gleicher Weise wie oben beschrieben auf das Netz aufgebracht. Die nach diesen Verfahren präparierten Netze wurden einige Stunden bis einen Tag an der Luft (Petrischale oder Exsikkator) liegen gelassen und anschließend elektronenmikroskopisch untersucht. Die elektronenmikroskopische Vergrößerung betrug 40 000 : 1; die Gesamtvergrößerung 80 000 : 1. Zusätze vor der Vesikelbildung wurden immer zwischen 5 und 10 Gewichtsprozenten des Vesikelbildner eingewogen. Die pH-Werte wurden mit einem pH-Meter (Fa. Knick) eingestellt.

7.10.3. Einschlußversuche mit Magnesium-octaethylporphin (MgOEP)

7.10.3.1. Präparation der Vesikellösungen

Normalerweise wurden 10 mg Amphiphil und 1 mg MgOEP 59 in Methanol oder Chloroform/Methanol 5:1 gelöst und das Lösungsmittel wurde im Wasserstrahlvakuum abgezogen. Es entstand ein Lipidfilm auf der Glaswand. Als Referenzlösung wurde derselbe Film hergestellt ohne Zusatz von 59. Zu den Lipidfilmen wurde jeweils 5-10 ml bidestilliertes Wasser gegeben und die Suspensionen wurden beschallt.

Von den beschallten Lösungen wurden Elektronenspektren aufgenommen. Die entsprechenden pH-Werte wurden durch Titration der Vesikellösung mit 0,1 N HCl- bzw. 0,1 N NaOH-Lösung eingestellt. Die pH-Werte wurden mit einem pH-Meter (Fa. Knick) gemessen. Die Membran wurde durch Zugabe von 1%iger bzw. 10%iger Triton X 100 -Lösung zerstört. Durch die Beschallung der sus-

pendierten Lipidfilme ergaben sich klare bis leicht trübe rot-violette bis rotbraune Lösungen. Alle Lösungen liefen über Sephadex G 25-Säulen als scharfe Zonen, bei der Elution mit Wasser.

7.10.3.2. Einschluß von MgOEP 59 in die Membran aus 38

Elektronenspektren:

pH	λ -Werte -nm- (E)
6	580 (0,305), 543 (0,315), 404 (1,86);
2	575 (0,315), 542 (0,325), 405 (0,42);
2 + (T)625	(0,136), 578 (0,156), 542 (0,184), 505 (0,174), 407 (0,94); (nach 30 Minuten)
2 + (T)625	(0,145), 578 (0,156), 542 (0,184), 505 (0,18) (nach 90 Minuten);

7.10.3.3. Einschluß von MgOEP 59 in die Membran aus 30

Elektronenspektren:

pH	λ -Werte -nm- (E)
12	626(0,15), 572(0,225), 543(0,315), 505(0,41), 385(1,5);
6	624(0,22), 575(0,32), 542(0,4), 502(0,49), 392(1,02);
4,5	620(0,125), 595(0,12), 562(0,166), 535(0,182), 498(1,68) 408(1,52), 398(1,52);
2	599(0,15), 556(0,35), 528(0,21);
2 + (T)626	(0,20), 575(0,30), 542(0,42), 502(0,51) (nach 60 Minuten);

7.10.3.4. Einschluß von MgOEP 59 in die Membran aus 34

Elektronenspektren:

pH	λ -Werte -nm- (E)
5	562(0,092), 535(0,15), 498(0,11), 410 (0,57);
3	590(0,124), 564(0,13), 551(0,13), 410 (0,46);
2 + (T)627	(0,046), 580(0,094), 543(0,13), 516 (0,134), 506(0,13), 409(1,06) (nach 120 Minuten);

7.10.3.5. Einschluß von MgOEP 59 in die Membranen aus 24 und 46

Elektronenspektrum (für 24):

pH	λ -Werte -nm- (E)
11	626(1,42), 586(1,92), 548(2,04), 514(2,0);
7	626(1,42), 586(1,92), 548(2,00), 514(2,0);

Nach Zugabe von Triton X 100-Lösung keine Veränderung.

Elektronenspektrum (für 46):

pH λ -Werte -nm- (E)

12 628(0,54), 573(0,64), 545(0,88), 516(0,96);

3,6 628(0,56), 573(0,76), 544(1,12), 516(1,3);

2 628(0,56), 573(0,76), 544(1,12), 508(1,26);

2 +(T)628(0,6), 573(0,78), 544(1,14), 508(1,26);

7.10.3.6. Einschluß von MgOEP 59 in die Membran aus 48

Elektronenspektrum:

pH λ -Werte -nm- (E)

7 617(0,26), 564(0,56), 532(0,7), 498(0,74)

8 617(0,3), 572(0,35), 544(0,54), 517(0,6);

Bei Zugabe von Triton X 100-Lösung keine Veränderung.

7.10.4. Metachromasie

1 ml einer 10^{-3} M Acridinorange- bzw. Methylenblau-Stammlösung (301 mg Acridinorange 57 in 1 l bidestilliertem Wasser; 374 mg Methylenblau 58 in 1 l bidestilliertem Wasser) wurde mit Wasser bzw. 0,1N HCl-Lösung soweit verdünnt, daß sich mit Vesikelzusatz eine Gesamtlösung von 15 ml ergab. 3×10^{-3} Vesikellösungen wurden hergestellt durch Beschallen von 200 mg 24, 227 mg 25 und 245 mg 38 in 100 ml Wasser bzw. auf pH 2 eingestellter saurer Lösung. Dann wurden Titrationen der Farbstofflösungen mit den entsprechenden Vesikellösungen in 100 μ l-Schritten durchgeführt. Das Verhältnis Farbstoff zu Vesikelbildnern wurde durch die Titrationen variiert von 1:1 bis 1:10 für die doppelschichtigen Amphiphile 24 und 25 bzw. von 1:1 bis 1:3 für das Amphiphil 38. Zur Herstellung der gemischten Vesikellösungen wurden die entsprechenden Gewichtsverhältnisse an 24 und 25 bzw. an 24 und 38 eingewogen, mit Wasser bzw. auf pH 2 eingestellter saurer Lösung beschallt und dann titriert.

Die Temperaturabhängigkeit des metachromatischen Effektes wurde bei 25°C, 30°C, 40°C und 50°C bei einem Farbstoff-Vesikel-Verhältnis von 1:7 gemessen.

Es wurden 3×10^{-3} M Vesikellösungen der Phosphorsäureamphiphile 46 und 48 hergestellt und die Titrationen wie oben bei pH 8-8,5 bzw. 5 durchgeführt.

7.10.4.1. Einschluß von Methylenblau 58 in die Membran aus 38

Eine Lösung (pH 2) aus Acridinorange 57 (10^{-2} M) und 38 (10^{-3} M) wurde zusammenbeschallt. Der nichteingeschlossene Farbstoff 57 wurde durch Ionenaustauscherchromatographie über Amberlite IRC 50 abgetrennt.

Elektronenspektrum des Eluats: $\lambda = 608 \text{ nm}$ (0,1)

Elektronenspektrum des Eluats nach Zugabe von 0,1 ml 0,23 M Natriumdithionitlösung: $\lambda = 608 \text{ nm}$ (0,1);

Elektronenspektrum des Eluats nach Zugabe von 0,25 ml 1%ige Triton X 100-Lösung zur Eluat/Dithionit-Lösung: die Bande verschwindet.

7.10.4.2. Einschluß von 1a in die Membranen aus 30, 34 und 38

7.10.4.2.1. Einschluß von 1a in die Membran aus 38

10 mg 38 und 1 mg 1a wurden unter Stickstoff bei pH 6,5 beschallt. Die klare Vesikellösung wurde unter Stickstoffspülung mit 0,25 ml 0,23M Natriumdithionitlösung versetzt.

Elektronenspektrum: $\lambda = 606 \text{ nm}$; nach Zugabe von 0,25 ml 1%iger Triton X 100-Lösung: $\lambda = 562 \text{ nm}$ und 606 nm . 100% Reduktion;

7.10.4.2.2. Einschluß von 1a in die Membran aus 30

Der gleiche Versuch, wie unter 7.10.4.2.1. beschrieben, wurde mit der Verbindung 30 durchgeführt (siehe Abb.61, Seite 98).

7.10.4.2.3. Einschluß von 1a in die Membran aus 34

Der gleiche Versuch, wie unter 7.10.4.2.1. beschrieben, wurde mit der Vesikellösung 34 durchgeführt (siehe Abb.61, Seite 98).

7.10.5. ^1H -NMR-Untersuchungen an Vesikellösungen

7.10.5.1. Temperaturabhängigkeit der Methylenprotonen bei doppelschichtigen Membranen

Die Linienbreiten der Methylenprotonen bei $\delta = 1,3 \text{ ppm}$ einer Vesikellösung, die aus 5 mg 27 in 5 ml D_2O hergestellt wurde, wurden bei 6 verschiedenen Temperaturen gemessen.

20°C (-), 40°C (-), 45°C (32 Hz), 50°C (32 Hz), 55°C (32 Hz), 60°C (56 Hz);

Bei 20°C wurden 80, bei 40 – 60°C 400 scans gefahren. Das Spektrum zeigte keine Signale bis 40°C .

Die Linienbreite der Methylenprotonen einer Vesikellösung aus 24 betrug bei 50°C (40 scans) 20 Hz.

7.10.5.2. Temperaturabhängigkeit des ^1H -NMR-Spektrums bei Bola-amphiphilen

7.10.5.2.1. symmetrische Membran aus 30

Die ^1H -NMR-Spektren einer Vesikellösung, die aus 10 mg 30 in 5 ml D_2O hergestellt wurde, wurden bei 7 verschiedenen Temperaturen aufgenommen. Die Linienbreiten der Methylenprotonen bei $\delta = 1,5 \text{ ppm}$ (die Protonen wurden von $\delta = 1,3 \text{ ppm}$ auf $\delta = 1,5 \text{ ppm}$)

apparativ gesetzt) lauteten:

30°C(16 Hz), 40°C(16 Hz), 50°C(16 Hz), 60°C (12 Hz), 70°C (12 Hz), 80°C(12 Hz), 90°C(12 Hz);

Bei allen Temperaturen wurden 40 scans gefahren.

Im Gegensatz zu den doppelschichtigen Membranen sind auch die Kopfgruppenprotonen im Spektrum deutlich zu erkennen.

T°C δ (ppm) (Anzahl der Protonen)

30 1,5(32)/1,84(8)/3,1(3)/3,54(3)/3,98(1)/4,35(5);

40 1,5(32)/1,84(8)/3,1(3,5)/3,54(3,5)/3,98(1)/4,34(7,5);

50 1,5(32)/1,84(8)/3,1(3,75)/3,54(3,6)/3,98(1)/4,34(6);

80 1,5(32)/1,84(8)/3,1(2,7)/3,54(2,7)/3,98(1)/4,34(8);

90 1,5(32)/1,84(8)/3,1(3)/3,54(3) -

Aus den Spektren geht hervor, daß in D₂O die Protonen bei δ = 3,98 ppm, die eigentlich mit einer Intensität 2 erscheinen müßten, zu 50% ausgetauscht werden.

Ein Versuch der Zugabe von NaOD zu der beschallten Lösung 30 und Messung des Spektrums scheiterte, da im ¹H-NMR-Spektrum sowohl bei 30°C als auch bei 50°C nur noch die Methylenprotonen bei δ = 1,3 ppm zu erkennen waren. Es konnte also nicht festgestellt werden, ob die Protonen bei δ = 3,98 durch NaOD-Zugabe vollständig austauschen.

Auch bei der Vesikellösung von 29 in D₂O/NaOD waren im NMR-Spektrum bei 50°C nur das Signal für die Methylenprotonen bei δ = 1,3 ppm zu sehen. Ob ein H-D-Austausch stattfand kann nicht beurteilt werden. Die Spektren mit NaOD-Zusatz wurden mit 40 scans gefahren.

7.10.5.2.2. unsymmetrische Membran aus 38

Die Linienbreiten der Methylenprotonen bei δ = 1,3 ppm einer Vesikellösung, die aus 10 mg 38 in 5 ml D₂O hergestellt wurde, wurden bei 5 verschiedenen Temperaturen gemessen.

20°C(14 Hz), 30°C(12 Hz), 40°C(12 Hz), 50°C (10 Hz), 70°C(10 Hz);

Bei allen Temperaturen wurden 40 scans gefahren. In allen Spektren waren die Kopfgruppenprotonen sehr schlecht zu erkennen. (S.Abb.63a).

7.10.6. Stabilität von Vesikellösungen

10 mg des Bolaamphiphils 38 wurden gemäß der allgemeinen Prozedur in 10 ml 1 N HCl-Lösung für 20 Minuten beschallt. Die klare Vesikellösung wurde im Trockenschrank bei 70°C inkubiert. Nach 1,2,4,8,16,24 und 48 Stunden wurden jeweils Proben von 1 ml Volumen entnommen, neutralisiert und mit Chloroform extrahiert. Die so gewonnenen Chloroformphasen wurden dünn-schichtchromatographisch auf 1,12-Dodecandiol 8 untersucht. 1,12-Dodecandiol: $R_f = 0,55$ (Kieselgel, Dioxan, Rhodamin B-Sprühreagenz 0,1%);

Der gleiche Versuch wurde mit dem Phosphorsäuretetrolid 48 und den doppelschichtigen Vesikellösungen aus 24 und 46 durchgeführt. Bei den doppelschichtigen Vesikellösungen wurde auf 1-Hexadecanol geprüft.

1-Hexadecanol: $R_f = 0,35$ (Kieselgel, Chloroform, Rhodamin B-Sprühreagenz 0,1%);

Die gleichen Versuche wurden in alkalischer Lösung durchgeführt (10 ml 1 N NaOH-Lösung). Dünnschichtchromatographisch konnte in keiner Probe, mit Ausnahme der vesikulären Lösung aus 46 in saurer Lösung, 1,12-Dodecandiol bzw. 1-Hexadecanol nachgewiesen werden. Eine gaschromatographische Untersuchung auf 1,12-Dodecandiol 8 ($R_t = 12,53$ (SE 30/19) und 7,97 (Silicon-gummi 17/6) lieferte ebenfalls kein 1,12-Dodecandiol 8.

7.10.6.1. Versuchte Synthese des Maleinsäuremakrotetrolids 10 in vesikulärer Lösung aus 38

20 mg des Bolaamphiphils 38, 2 mg 11 und 1 mg 8 wurden in 10 ml 1 N HCl-Lösung für 20 Minuten beschallt. Die Lösung wurde bei 70°C im Trockenschrank inkubiert. Proben von 1 ml Volumen wurden nach 1,2,4,8,16,24 und 48 Stunden entnommen, neutralisiert und mit Chloroform extrahiert. Die so gewonnenen Chloroformphasen wurden dünn-schichtchromatographisch auf die Bildung des Maleinsäuretetrolids 10 untersucht.

10: $R_f = 0,69$ (Kieselgel, Benzol/Dioxan/Eisessig 90:25:4, 1,7-Dichlorfluoreszein-Sprühreagenz 0,1%);

Das Tetrolid 10 konnte in keiner Probe nachgewiesen werden.

8. LITERATURVERZEICHNIS

1. R.Zana, S.Yiv, K.M.Kale, J.Colloid Interface Sci. 77, 456 (1980)
2. J.H.Fendler: Membrane Mimetic Chemistry, Wiley, New York 1982.
3. J.-H.Fuhrhop, Angew.Chem. 88, 704 (1976); Angew.Chem.Int.Ed. Engl. 15, 648 (1976)
4. A.Gliozzi, R.Rolandi, M.DeRosa, A.Gambacorta, B.Nicolaus in R.Antolini et al: Transport in Biomembranes, Model Systems and Reconstitution, Raven Press, New York 1982
5. S.Massari, D.Pascolini, Biochemistry 16, 1189 (1977)
6. J.-H.Fuhrhop, D.Fritsch, B.Tesche, H.Schmiady, J.Am.Chem.Soc., 106, 1998 (1984)
7. Y.Okahata, T.Kunitake, J.Am.Chem.Soc., 101, 5231 (1979)
8. J.-H.Fuhrhop, W.Kaufmann, W.Schambil, Dtsch.Pat.-Anm. D:6771 (1983), Fa.Henkel
9. J.-H.Fuhrhop, H.Bartsch, Liebig's Ann.Chem., 802 (1983)
10. M.Mauk, R.C.Gamble, J.D.Baldeschwieler, Proc.Natl.Acad.Sci. USA, 77(8), 4430 (1980)
11. F.Wagner, J.Gen.Microbiol., 115, 491 (1979)
12. T.Kunitake, T.Sakamoto, J.Am.Chem.Soc. 100, 4615 (1978)
13. R.A.Moss, G.Bizzigotti, J.Am.Chem.Soc. 103, 6512 (1981)
14. Y.Murakami, A.Nakano, A.Yoshimatsu, K.Fukuya, J.Am.Chem.Soc. 103, 728 (1981)
15. K.Ohkubo, K.Sugahara, K.Yoshinaga, R.Ueoka, J.Chem.Soc.Chem. Comm. 637 (1980)
16. M.F.Czarniecki, R.Braslow, J.Am.Chem.Soc. 101, 3675 (1979)
17. J.Bjorksten, Rejuvenation 8(3), 67 (1980)
18. W.H.Carothers, J.Am.Chem.Soc. 55, 5023 (1933)
19. E.P.Kohler et al., J.Am.Chem.Soc. 61, 1051 (1939)
20. K.Ziegler, H.Wilms, Liebig's Ann.Chem. 567, 1 (1950)
21. K.Ziegler in: "Methoden der Organischen Chemie" (Houben-Weyl) 4.Aufl., Allgemeine Chemische Methoden, S.733ff, Thieme Verlag Stuttgart 1965
22. R.N.Greene, Tetrahedron Lett. 1793 (1972)
23. J.S.Bradshaw, Chem.Rev. 79, 37 (1979)
24. C.J.Pedersen, J.Am.Chem.Soc. 89, 2495 (1967)
25. S.E.Drews et al., J.Chem.Soc.Perkin Trans. I, 1908 (1974)

26. S.E.Drews et al., J.Chem.Soc.Perkin Trans. I, 2578 (1974)
27. Ed.:E.Bartholomé et al., Ullmanns Enzyklopädie der Techn. Chemie, 4.Aufl., Band 11, S.109, Verlag Chemie, Weinheim
28. Ed.:A.H.Blatt, Org.Synth.Coll.Vol.II, Wiley, New York 1943; siehe auch:A.Manske, J.Am.Chem.Soc. 53, 1106 (1931)
29. Organikum, AAV S.549, VEB Deutscher Verlag der Wissenschaften, 10.Aufl., Berlin 1971
30. J.Shereshefsky, A.A.Wall, J.Am.Chem.Soc. 66, 1078 (1944)
31. J.Klaban, S.Hudecek, Coll.Czech.Chem.Comm. 25, 2307 (1960)
32. F.Trefflich, F.Kasper, Z.Chem. 15, 185 (1975)
33. J.Wislencius, Chem.Zentralblatt, 259 (1897 II)
34. P.Eggert, Phys.Z. 24, 505 (1930)
35. C.B.Barrett, M.S.J.Dallas, F.B.Padley, Chem. and Ind. 1050 (1962)
36. L.J.Morris, Chem. and Ind. 1238 (1962)
37. Ed.:N.S.Bhacca, L.F.Johnson, J.N.Shoolery, Varian, NMR-Spectra Catalog, National Press 1963, Nr. 212 und 213
38. California Res.Corp. US 2 816 922/3, 1954
39. Allied Chem.Corp. US 2 393 352, 1942
40. Halcon US 3 262 972, 1963
41. United Rubber Comp. US 2 454 385/7, 1946
42. Die vorläufigen Röntgenstrukturanalysen wurden durchgeführt von G.Luger, Institut für Kristallographie, FU Berlin
43. Die Untersuchungen an den schwarzen Lipidmembranen wurden von A.Fahr, Fachbereich Physik, FU Berlin, durchgeführt.
44. M.S.Kharash, C.F.Fuchs, J.org.Chem. 13, 97 (1948)
45. E.J.Morgan, E.Friedman, Biochem.J. 32, 733 (1938)
46. A.Schöberl, A.Wagner in:"Methoden der Organischen Chemie" (Houben-Weyl), ed. E.Müller, Thieme Verlag, 4.Aufl., 1955, Bd. IX, S.1243
47. A.Schöberl, A.Wagner, Chem.Ber. 80, 379 (1947)
48. M.Brink, Tetrahedron 24, 7005 (1968)
49. F.Muth in:"Methoden der Organischen Chemie" (Houben-Weyl), ed. E.Müller, Thieme Verlag, 4.Aufl., 1955, Kap.13
50. Deutsches Reichspatent 676013 (1936)
51. Ed.:D.Barton, W.D.Ollis:Comprehensive Organic Chemistry, Vol.3, S.317, Pergamon Press, New York 1979

52. S.Smiles, C.M.Bere, Org.Synth.Coll.Vol.I, 7 (1932)
53. H.Weitkamp, R.Barth: Infrarot-Strukturanalyse, Thieme Verlag Stuttgart 1972
54. Ed.:E.Stahl, Dünnschichtchromatographie, 2.Aufl.,Springer Verlag, Berlin 1967
55. J.-H.Fuhrhop, K.Ellermann, H.H.David, J.Mathieu, Angew. Chem. 94, 444 (1982)
56. H.Günther:NMR-Spektroskopie, Thieme Verlag, Stuttgart 1957
57. H.Suhr:Anwendungen der kernmagnetischen Resonanz in der org. Chemie, Springer Berlin 1965
58. M.Barfield, D.M.Grant, J.Am.Chem.Soc. 85, 1899 (1963)
59. R.L.Mayhew, E.P.Williams, General Aniline and Film Corp. US 3 089 888, 1963
60. A.W.Schwab, J.Am.Chem.Soc. 76, 623 (1954)
61. A.Larsson, Trans.Chalmers Univ.Technol.Göteborg Swe. 47, 3 (1945)
62. E.E.Bullock, J.M.W.Scott, P.D.Golding, Chem.Comm. 168 (1967)
63. D.J.Cram, S.H.Pine, J.Am.Chem.Soc. 85, 196 (1963)
64. S.Wolfe, Acc.Chem.Res. 5, 102 (1972)
65. R.A.Mortara, F.H.Quina, H.Chaimovich, Biochim.Biophys.Res. Comm. 81(4), 1080 (1978)
66. J.H.Fendler, Acc.Chem.Res. 13, 7 (1980)
67. J.R.Escabi-Perez, A.Romero, S.Lukac, J.H.Fendler, J.Am.Chem. Soc. 101, 2231 (1979)
68. J.Plimmer, S.Burch, J.Chem.Soc. 108 (1932)
69. H.v.Euler, A.Bernton, Chem.Ber. 60, 1720 (1927)
70. A.H.J.Houssa, H.Phillips, J.Chem.Soc. 108 (1932)
71. T.Kunitake, Y.Okahata, Bull.Chem.Soc.Jpn 51(6), 1877 (1978)
72. S.Cremlyn, P.Dewhurst, Synthesis 648 (1971)
73. D.M.Brown, H.M.Higson, J.Chem.Soc. 2034 (1957)
74. E.Eidebenz, M.Depner, Archiv der Pharmazie 280, 227 (1942)
75. E.Pretsch, T.Clerc, A.Seibl, W.Simon:Strukturaufklärung org. Verbindungen, Springer Verlag, Berlin 1981
76. N.F.Chamberlain:The Practice of NMR-Spektroscopy, Plenum Press, New York 1974

77. T.Masamichi, F.Kuriyagawa, Bull.Chem.Soc.Jpn., 40, 1813 (1967)
78. D.Gagniere, J.B.Robert, Bull.Soc.Chim.France 2240 (1967)
79. F.Ramirez et al., J.Am.Chem.Soc. 85, 1874 (1963)
80. P.Rapp, H.Bock, E.Urban, F.Wagner, W.Gebetsberger, W.Schulz, DECHEMA Monogr. 81, 177 (1977)
81. T.M.S.Chang:Artificial Cells, Thomas, Springfield, III 1972
82. S.W.Fox, Naturwissenschaften 56, 1 (1969)
83. Ed.:E.Bartholomé et al. Ullmanns Enzyklopädie der Techn. Chemie, 4.Aufl., Bd.11, S.109, Verlag Chemie, weinheim 1976
84. O.Dimroth, H.Kämmerer, Ber.Dtsch.Chem.Ges. 53B, 471 (1920)
85. M.A.Ali, L.J.Haynes, J.Chem.Soc. 1033 (1959)
86. J.C.Overeem, G.J.M.van der Kerk, Rec.Trav.Chim.Pays-Bas 83, 1023 (1964)
87. O.Dimroth, H.Kämmerer, Chem.Ber. 53B, 478 (1920)
88. W.v.Miller und Rohde, Chem.Ber. 30, 1760 (1897)
89. Ed.:D.Chapman, D.F.H.Wallach:Biological membranes, Vol. I-III, Academic Press, New York 1969-1976
90. S.M.Johnson, A.D.Bangham, U.W.Hill, E.D.Korn, Biochim.Biophys.Acta 233, 820 (1969)
91. C.Huang, Biochemistry 8, 344 (1969)
92. S.Batzri, E.D.Korn, Biochim.Biophys.Acta 443, 629 (1976)
93. F.Szoka jr., D.Papahadjopoulos, Proc.Natl.Acad.Sci. USA 75, 4194 (1978)
94. M.H.W.Milsman, R.A.Schwedener, H.G.Weder, Biochim.Biophys. Acta, 512, 147 (1978)
95. V.Rhoden, S.M.Goldin, Biochemistry, 18, 4173 (1979)
96. O.Zumbühl, H.G.Weder, Biochim.Biophys.Acta 640, 252 (1981)
97. K.Ellermann, Staatsexamensarbeit, FU Berlin 1982
98. Ed.:E.Bartholomé et al., Ullmanns Enzyklopädie der Techn. Chemie, 4.Aufl., Band 11, S.657, Verlag Chemie, Weinheim 1976
99. L.Bachmann, W.Dasch, P.Kutter, Ber.Bunsenges.Phys.Chem., 85, 883 (1981)
100. J.-H.Fuhrhop, J.Mathieu, Angew.Chem. 96, 124 (1984); Angew. Chem.Int.Ed.Engl. 23, 133 (1984)
101. J.-H.Fuhrhop, J.Mathieu, J.Chem.Soc.Chem.Comm., 144 (1983)
102. R.Neu, Fette und Seifen, 52, 349 (1950)

103. G.W.Ströhl, Z.analyt.Chem. 239, 240 (1968)
104. J.Longwyn, Analyst 80, 167 (1955)
105. S.Massari, D.Pascolini, Biochemistry 16, 1189 (1977)
106. K.Yamaoka, M.Takatsuki, Bull.Chem.Soc.Jpn., 51, 3182 (1978)
107. K.Yamaoka, M.Takatsuki, M.Miura, Bull.Chem.Soc.Jpn., 48, 2739 (1975)
108. A.McAdam, M.Currie, J.C.Speakman, J.Chem.Soc. A, 1094 (1971)
109. S.Neoka, T.Fujiwara, K.-I.Tomita, Bull.Chem.Soc.Jpn., 45, 3634 (1972)
110. H.Hauser, I.Pascher, R.H.Pearson, S.Sundell, Biochim.Biophys.Acta, 650, 21 (1981)
111. N.Nakashima, T.Kunitake, J.Am.Chem.Soc. 104, 4261 (1982)
112. S.J.Baum, B.F.Burnham, R.A.Plane, Proc.Natl.Acad.Sci. USA 52, 1248 (1949)
113. J.-H.Fuhrhop, Habilitationsschrift, TU Braunschweig, 1972
114. K.Smith: Porphyrins and Metalloporphyrins, Elsevier 1975
- 115a. H.H.David, Dissertationsarbeit FU Berlin, in Vorbereitung;
U.Wanja, Dissertationsarbeit FU Berlin, in Vorbereitung;
115. T.Kunitake, Y.Okahata, J.Am.Chem.Soc. 99, 3860 (1977)
116. R.J.Kostellnik, S.M.Castellano, J.Magn.Res. 9, 291 (1973)
117. S.B.Andrews, J.W.Faller, J.M.Gilliam, R.J.Barnett, Proc. Natl.Acad.Sci. USA 70, 1814 (1973)
118. J.A.Berden, R.W.Barker, G.K.Radda, Biochim.Biophys.Acta, 375, 186 (1975)
119. J.Metcalfe, N.J.M.Birdsall, A.G.Lee, Ann.New York Acad. Sci. 222, 460 (1973)
120. S.Nir, J.Bentz, J.Wilshut, Biochemistry 19, 6030 (1980)
121. J.-H.Fuhrhop, H.Bartsch, D.Fritsch, Angew.Chem. 93, 797 (1981); Angew.Chem.Int.Ed.Engl. 20, 804 (1981)
122. Y.Okahata, T.Kunitake, J.Am.Chem.Soc. 101, 5231 (1979)
123. Die Röntgenbeugungsdiagramme am Feststoff 38 wurden von G.Büldt, Fachbereich Physik, FU Berlin, 1983 aufgenommen.
124. A.D.Bangham, M.W.Hill, E.D.Korn, S.M.Johnson, Biochim. Biophys.Acta, 233, 820 (1971)
125. J.-H.Fuhrhop, U.Liman, J.Am.Chem.Soc., eingereicht zur Veröffentlichung
126. T.Kunitake et al., J.Am.Chem.Soc., 103, 5401 (1981)

L E B E N S L A U F

Name	:	Joachim Mathieu
geboren am	:	7. November 1952
in	:	Hohenecken, Kreis Kaiserslautern
Eltern	:	Jakob Mathieu, Versicherungsinspektor, und Frau Gertrud, geb. Schallmo
Familienstand	:	ledig
 Ausbildung:		
April 1959 - April 1963	:	Volksschule Hohenecken
April 1963 - Mai 1971	:	Staatliches Alt- und Neusprachliches Gymnasium in Kaiserslautern
Mai 1971	:	Reifeprüfung am Gymnasium Kaiserslautern
Okt. 1973	:	Immatrikulation zum Studium der Chemie an der Universität Kaiserslautern
Okt. 1975	:	Diplom-Chemiker-Vorprüfung
Okt. 1975	:	Immatrikulation zum Hauptstudium an Freien Universität Berlin
Juli 1979	:	Diplom-Chemiker-Hauptprüfung
März 1979 - Juli 1979	:	Diplomarbeit über " Ramanspektren von Polyboraten in wässriger Lösung " bei Herrn Prof. Dr. G. Heller am In- stitut für Anorganische Chemie der FU Berlin
Dez. 1979	:	Beginn der vorliegenden Dissertation bei Herrn Prof. Dr. J.-H. Fuhrhop am Institut für Organische Chemie der FU Berlin
 Wehrdienst:		
Juli 1971 - Juni 1973	:	Reserveoffizierslaufbahn, Leutnant der Reserve
 Beruflicher Werdegang:		
Okt. 1979 - Sept. 1981	:	Wissenschaftlicher Teilzeitassistent am Institut für Organische Chemie
seit Okt. 1981	:	Wissenschaftlicher Assistent im Praktikum "Organische Chemie für Fort- geschrittene" an der FU Berlin

